

**Analyse des Proteinmusters der epithelialen Drüsen
im Endometrium und bei der Endometriose**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Hashmat Nurzay

aus Gießen

Gießen 2017

Aus dem Zentrum für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. H.-R. Tinneberg

Gutachter: PD. Dr. Lutz Konrad

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 27. August 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Definition und Geschichte.....	1
1.2 Epidemiologie.....	2
1.3 Lokalisation und Klassifikation.....	3
1.4 Makroskopie und Histologie.....	6
1.5 Pathogenese.....	10
1.6 Klinik, Diagnostik und Therapie.....	13
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	16
3. Material und Methode.....	18
3.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben.....	18
3.2 Prinzip der Immunhistochemie.....	19
3.2.1 Immunhistochemie nach der Envision™-Methode.....	20
3.2.2 Vorbehandlung der Gewebeproben.....	21
3.2.3 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	22
3.2.4 Entparaffinierung.....	22
3.2.5 Antigendemaskierung.....	23
3.2.6 Blockierung und Absättigung.....	23
3.2.7 Immunhistochemische Färbungen.....	24
3.2.8 Arbeitsprotokoll Immunhistochemie.....	25
3.3 Beschreibung und Eigenschaft der getesteten Antikörper.....	27
3.3.1 Antikörper β - Sarcoglykan.....	27
3.3.2 Antikörper Enpp2.....	28
3.3.3 Antikörper Pck2.....	29
3.3.4 Antikörper Pace 4.....	30

3.3.5 Antikörper Gsk3 β	31
3.3.6 Antikörper CD9.....	32
3.3.7 Antikörper WDR13.....	33
3.4 Digitale Auswertung.....	34
3.5 Statistische Auswertung.....	34
3.6 Chemikalien.....	35
3.7 Zusammensetzung der Lösungen.....	35
3.8 Verbrauchsmaterialien.....	36
3.9 Laborgeräte.....	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1 Zusammenschau der verwendeten Proben für β -SG, Enpp2 und Pck2.....	39
4.2 Screening von Proteinen für epitheliale Zellen im Uterus, Ovar, PE und DIE..	41
4.2.1 Lokalisation von Pace4 im Uterus und in der Endometriose.....	41
4.2.2 Lokalisation von Gsk3 β im Uterus und in der Endometriose.....	43
4.2.3 Lokalisation von CD9 im Uterus und in der Endometriose.....	46
4.2.4 Lokalisation von WDR13 im Uterus und in der Endometriose.....	48
4.3 Etablierung der drei Marker β -SG, Enpp2 und Pck2.....	50
4.3.1 Lokalisation von β -SG im Uterus und in der Endometriose.....	51
4.3.2 Lokalisation von Enpp2 im Uterus und in der Endometriose.....	57
4.3.3 Lokalisation von Pck2 im Uterus und in der Endometriose.....	62
4.4 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 im Endometrium.....	70
4.5 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der ovariellen Endometriose.....	71
4.6 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der peritonealen Endometriose.....	72
4.7 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der DIE.....	73
5. Diskussion.....	74
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	74

5.2 Analyse der Marker β -SG, Enpp2 und Pck2.....	75
5.2.1 Analyse von β -SG.....	75
5.2.2 Analyse von Enpp2.....	78
5.2.3 Analyse von Pck2.....	81
5.4 Diskussion der Ergebnisse im Endometrium und der Endometriose.....	83
5.5 Ausblick.....	89
6. Zusammenfassung (deutsch/englisch).....	90
7. Abkürzungsverzeichnis.....	92
8. Abbildungsverzeichnis.....	94
9. Tabellenverzeichnis.....	95
10. Literaturverzeichnis.....	97
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	120
12. Danksagung.....	121
13. Lebenslauf.....	122

1. Einleitung

1.1 Definition und Geschichte

Endometriose ist definiert als die Anwesenheit und das Wachstum von endometriumähnlichen Zellstrukturen außerhalb der Gebärmutter (Olive und Schwartz 1993, Adamson 1999). Eine weitere pathologische Ausdrucksform ist die Adenomyose, mit Endometrioseinseln im Myometrium (Schindler 2007). Das Endometrium zeigt Drüsenzellen und bindegewebige Stützgerüstzellen, sogenannte Stromazellen, auf. Das gynäkologische Erscheinungsbild der Endometriose ist als eine gutartig wuchernde Erkrankung der Frau zu verstehen (Schindler 2007). Endometrioseherde sind überwiegend oberflächlich peritoneal, ovariell, aber auch in tieferen Strukturen als tief infiltrierende Endometriose (DIE) im kleinen Becken vorzufinden (Ulrich und Herchenbach 2010). Die Endometriose reagiert meist auch auf hormonelle Schwankungen, ähnlich wie im Endometrium (Ulrich und Herchenbach 2010, Zhu et al. 2012). Der Begriff Endometriose taucht in der Medizin zum ersten Mal 1925 auf; Wegbereiter war John Albertson Sampson (Clement 2001). Zuvor gab es unterschiedliche deskriptive Veröffentlichungen mit nicht- einheitlichen Begriffen. Die erste datierte Beschreibung geht auf den Arzt Daniel Shroen aus Jena 1690 zurück. Er hatte damals in seiner Doktorarbeit „Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Ulceri“ die Morphologie der Endometriose beschrieben (Oehmke et al. 2007). Erst viele Jahre später wurden weitere Entdeckungen gemacht. Karl von Rokitansky beschrieb 1860 in Wien als erster Pathologe endometriale Drüsen im Myometrium (Rokitansky 1860). 1896 folgte der Chirurg Cullen mit ausführlichen Arbeiten zur Adenomyose (Benagiano und Brosens 2006). Ein Jahr danach dokumentierte Pfannenstiel in seinen Arbeiten rektovaginale endometriotische Lasionen (Brosset 1954). Im Jahr 1899 veröffentlichte Russell Arbeiten zur Beschreibung der ovariellen Endometriose, die jedoch auch schon 1793 von Johann Crell in Wittenberg dargestellt wurden. Crell beschrieb als einer der ersten die endometriotischen Zysten auf dem Ovar (Ebert 2011). Meyer charakterisierte im Jahre 1903 die Narbenendometriose und in den darauffolgenden Jahren den Befall der Lymphknoten sowie Teile des Dickdarms (Ebert 2011). Sampson folgte 1921 mit der detaillierten Beschreibung von hämorrhagischen Zysten im Ovar, besser bekannt als sogenannte „Schokoladenzysten“ (Sampson 1921). In den nachfolgenden Jahren hinterließ er grundlegende Beiträge zur Morphologie und Pathogenese der Endometriose (Clement 2001).

1.2 Epidemiologie

Unter allen benignen, proliferativen Erkrankungen der Frau gehört die Endometriose zur zweithäufigsten (Schweppe 2003). Die Zahl der Frauen, die weltweit von Endometriose direkt betroffen sind, wird auf ca. 176 Millionen taxiert (Adamson et al. 2010). Die Erkrankung kann nach der ersten Menarche in jedem Alter vorkommen (Keckstein 2009). Es gibt jedoch auch Ausnahmefälle, so wie etwa bei einer 9-jährigen, bei der unmittelbar vor der ersten Menstruation eine Endometriose pathologisch gesichert werden konnte (Ebert et al. 2009).

Konkrete Angaben über die Prävalenz und Inzidenz der Endometriose sind nur bedingt möglich (Houston 1984). Die Schwierigkeit besteht darin, dass es Schwankungen in den Patientenpopulationen, Verfahren und Kriterien für die Diagnose gibt. Außerdem mangelt es an gut entworfenen epidemiologischen Untersuchungsmethoden, die es mühsam machen, eine gesicherte Faktenlage zu erhalten (Ozkan et al. 2008).

Altersspezifisch stellen Frauen zwischen dem 25. und 40. Lebensjahr den Großteil des Patientenkollektivs dar. Mit zunehmendem Alter sinkt die Inzidenz der Endometriose (Missmer et al. 2004).

Einige Studien schätzen die Prävalenz von Endometriose bei Frauen im gebärfähigen Alter auf etwa 4- 10% (Wheeler 1989, Sangi-Haghpeykar und Poindexter 1995).

Im Gegensatz hierzu wurde die Inzidenz in einer Kohortenstudie auf ungefähr 11% beziffert (Buck Louis et al. 2011). Prävalenzschätzungen der Endometriose in der Klinik variieren je nach Diagnose (Cramer und Missmer 2002). Frauen mit primären Fruchtbarkeitsstörungen weisen eine Prävalenz von ca. 9- 50% auf (Duignan et al. 1972, Williams und Pratt 1977, Cramer 1986). Bei Patientinnen mit chronischen Unterbauchschmerzen liegt die Häufigkeit zwischen 45- 80% (Carter 1994, Schindler 2007).

Auch ethnologische Unterschiede konnten nachgewiesen werden. Bei Kaukasiern und Asiaten ist ein höheres Risiko als bei Afroamerikanern und Lateinamerikanern feststellbar (Missmer et al. 2004).

Mit der Diagnose Endometriose entstehen erhebliche Ausgaben für das Gesundheitssystem. Allein die Kosten für die stationäre Behandlung in Deutschland im Jahr 2006 beliefen sich auf geschätzte 40.708.716,26 € (Oppelt et al. 2012).

1.3 Lokalisation und Klassifikation

Endometrioseinseln können sich an unterschiedlichen Lokalisationen im Körper finden und werden in drei Formen eingeteilt: die peritoneale, ovarielle und die tief infiltrierende Endometriose (Donnez et al. 1995).

Die tief infiltrierende Endometriose (DIE) ist dadurch charakterisiert, dass ab ca. 5mm unter dem Peritoneum ektopes Drüsen- und zytogenes Stromagewebe zu finden ist (Cornillie et al. 1990). Heterotrophes, endometriales Drüsen- und Stromagewebe in der Gebärmuttermuskulatur wird unter dem Begriff „Adenomyosis uteri“ geführt (Ferenczy 1998). Eine etwas andere Einteilung hat sich in der deutschen Literatur durchgesetzt:

Endometriosis genitalis interna: Die Läsionen befinden sich in der Gebärmutter und entsprechen der Adenomyosis uteri (Halis et al. 2010).

Endometriosis genitalis externa: Endometrioseinseln kommen im kleinen Becken, wie z.B. im Ovar, Vagina oder Peritoneum, vor (Halis et al. 2010).

Endometriosis extragenitalis: Endometrioseherde sind außerhalb des kleinen Beckens vorhanden; betroffen sind hierbei häufig Dick- und Dünndarm sowie Harnblase, Harnleiter, Lunge, Leber und Bauchnabel (Halis et al. 2010).

Diese unterschiedlichen Entitäten differenzieren sich in Symptomatik, Krankheitsverlauf und daraus folgend auch in der Behandlungstherapie (Dunselmann 2001). Die nachfolgende Abb. 1 und Tab. 1 stellen die typischen Lokalisationen der Endometriose und ihre prozentuale Häufigkeit vor.

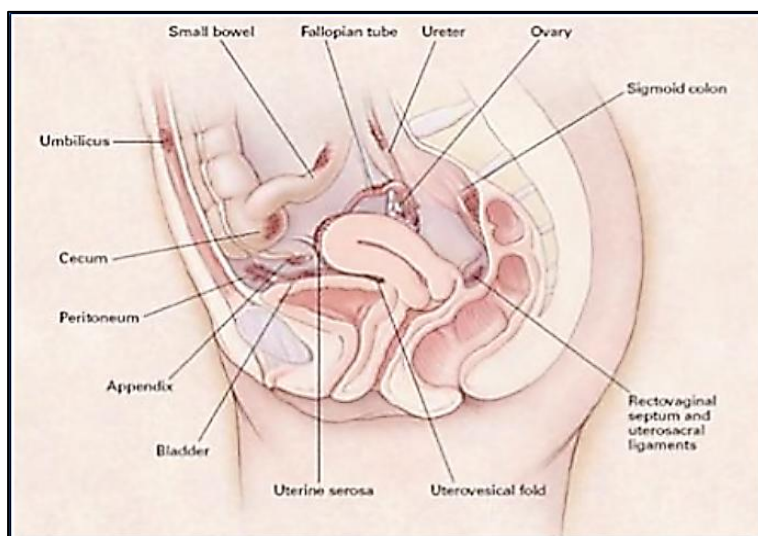


Abb. 1: Typische Lokalisationen endometriotischer Läsionen (Olive und Pritts 2001).

Tab. 1: Häufigkeit der Lokalisationen von Endometriose im Becken und Bauchraum (Schindler 2007).

Lokalisation	Häufigkeit
Ligamentum sakrouterinum	60%
Ovar	52%
Douglas	28%
Harnblase	15%
Ligamentum latum	16%
Rectum	12%
Mesosalpinx	10%
Ligamentum rotundum	5%
Eileiter	2-8%
Appendix	2%

Eine neuere Einteilung, der ENZIAN- Score (Abb. 2), stellt eine Ergänzung zum rASRM- Score (Abb. 3) dar (Haas et al. 2013a). Der ENZIAN- Score ist eine Klassifikation, mit der versucht wird, die tief infiltrierende, retroperitoneal gelegene Endometriose differenzierter zu erfassen und eine konforme Stadien- adaptierte Therapie anzustreben (Tuttlies et al. 2005). Die Strukturen werden unterteilt in drei Kompartimente:

- Kompartiment A: Douglasraum und Scheide
- Kompartiment B: Ligamenta sakrouterina bis hin zur Beckenwand
- Kompartiment C: Rektum und Sigmoideum

Der Schweregrad der Ausdehnung wird folgendermaßen bestimmt:

- Grad 1: < 1 cm
- Grad 2: 1- 3 cm
- Grad 3: > 3 cm

Tiefe Invasionen der Endometriose jenseits des kleinen Beckens und von Organen können auch separat erfasst werden (Haas et al. 2013b). Das Präfix "F" steht für entfernte Manifestationen, welche sich auf eine retroperitoneale Lokalisation beziehen (FA = Adenomyosis, FB = Beteiligung der Blase, FU = Eigenbeteiligung des

Harnleiters, FI = Darmerkrankungen kranial der rektosigmoidalen Kreuzung und FO= andere Orte, wie z.B. Bauchwand) (Haas et al. 2013b). Die Nomenklatur ist analog der TNM- Klassifikation. In Bezug auf die Korrelation mit den Symptomen fehlen für den ENZIAN- Score bisher hinreichende Daten (Haas et al. 2013b).

Die am weitesten verbreitete Klassifikation ist die American Society for Reproductive Medicine. Für die Klassifikation wurde ein Punktesystem entwickelt, der sogenannte rASRM- Score (Abb. 3). Es wird je nach Schweregrad der Läsion eine Einteilung in vier Stadien vorgegeben (American Society for Reproductive Medicine 1997).

I=gering (1- 5 Punkte)

II=mäßig (6- 15 Punkte)

III=schwer (16- 40 Punkte)

IV=ausgedehnt (> 40 Punkte)

Durch ein operatives Verfahren wird makroskopisch die Läsion charakterisiert. Es werden Anzahl, Lage, Ausbreitungsfläche, Infiltration sowie Verwachsungsgrad bewertet. In die Beurteilung gehen Peritoneum, Ovar und Tube ein (American Society for Reproductive Medicine 1997). Extragenitale Läsionen finden in dieser Klassifikation keine Berücksichtigung. Außerdem zeigt die rASRM- Klassifikation nur eine schwache Korrelation mit den Symptomen der Endometriose (Haas et al. 2013b).















Compartiment Grade	A RECTOVAGINAL SEPTUM VAGINA	B SACROUTERINE LIG. PELVIC WALL	C BOWEL	
Grade 1 < 1 cm				FA 
Grade 2 1–3 cm				FB 
Grade 3 > 3 cm				FU 
				FI 
				FO 

Abb. 2: Die revidierte Enzian Klassifikation (Haas et al. 2013b).




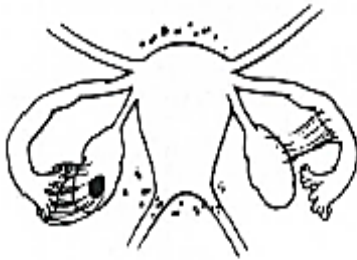
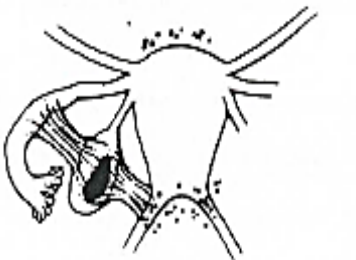

EXAMPLES & GUIDELINES		
STAGE I (MINIMAL)	STAGE II (MILD)	STAGE III (MODERATE)
		
PERITONEUM Superficial Endo - 1-3cm - 2 R. OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1 Filmy Adhesions - < 1/3 - 1 TOTAL POINTS - 4	PERITONEUM Deep Endo - > 3cm - 6 R. OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1 Filmy Adhesions - < 1/3 - 1 L. OVARY Superficial Endo - < 1cm - 1 TOTAL POINTS - 9	PERITONEUM Deep Endo - > 3cm - 6 CULDESAC Partial Obliteration - 4 L. OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16 TOTAL POINTS - 26
STAGE III (MODERATE)	STAGE IV (SEVERE)	STAGE IV (SEVERE)
		
PERITONEUM Superficial Endo - > 3cm - 4 R. TUBE Filmy Adhesions - < 1/3 - 1 R. OVARY Filmy Adhesions - < 1/3 - 1 L. TUBE Dense Adhesions - < 1/3 - 16* L. OVARY Deep Endo - < 1 cm - 4 Dense Adhesions - < 1/3 - 4 TOTAL POINTS - 30	PERITONEUM Superficial Endo - > 3cm - 4 L. OVARY Deep Endo - 1-3cm - 32** Dense Adhesions - < 1/3 - 8** L. TUBE Dense Adhesions - < 1/3 - 8** TOTAL POINTS - 52 *Point assignment changed to 16 **Point assignment doubled	PERITONEUM Deep Endo - > 3cm - 6 CULDESAC Complete Obliteration - 40 R. OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16 Dense Adhesions - < 1/3 - 4 L. TUBE Dense Adhesions - > 2/3 - 16 L. OVARY Deep Endo - 1-3cm - 16 Dense Adhesions - > 2/3 - 16 TOTAL POINTS - 114

Abb. 3: rASRM- Klassifikation (American Society for Reproductive Medicine 1997).

1.4 Makroskopie und Histologie

Das makroskopische Erscheinungsbild der Endometriose ist sehr heterogen. Die Läsionen stellen sich meist in Form kleiner Inseln dar, die vereinzelt im Ovar meist aus zystischen Strukturen und im Peritoneum meist aus beetförmigen, polypösen Implantaten bestehen können (Schweppe et al. 1990). In der Umgebung finden sich

bindegewebige, narbige und entzündliche Reaktionen (Keckstein 2009). Bei der peritonealen Endometriose findet man weiße, gelbe, rote und schwarze Herde, die bei den Patientinnen gleichzeitig vorliegen können. Sie variieren von pigmentierten bis hinzu nicht pigmentierten Herden (Schindler 2007).

Untersuchungen legen nahe, dass die Farbe der Läsion in der Endometriose Alter der Läsion, Drüsenmuster und Drüseninhalt widerspiegeln (Strehl et al. 2014).

Charakteristisch für die Ovarialendometriose sind große Zysten mit schokoladenartigem Inhalt, die sich durch Einblutungen entwickeln (Keckstein 2009). Die Zysten liegen zunächst oberflächlich auf den Eierstöcken, die sich mit der Zeit abkapseln und sich im Inneren der Ovarien ausbreiten (Keckstein 2009).

Die tief infiltrierende Endometriose wird von Koninckx und Martin (1992) in drei Untergruppen eingeteilt: Typ I ist konisch geformt und wird durch Infiltration gebildet; Typ II ist tief gelegen und durch umfangreiche Verwachsungen bedeckt; Typ III sind kugelförmige Knötchen mit der größten Ausdehnung unter dem Bauchfell und stellen gleichzeitig die schwerste und größte Art der Läsion dar (Koninckx und Martin 1992).

Die Besonderheiten bei der tief infiltrierenden Endometriose sind die schwierigen Beurteilungsmöglichkeiten und damit auch eine unzureichende Diagnosestellung; somit kann diese Art der Läsion nur postoperativ exakt beurteilt werden (Schindler 2007).

Die nachfolgenden Abbildungen stellen einige intra- und postoperative Befunde von den verschiedenen Endometriosearten dar (Abb. 4, 5 und 6).

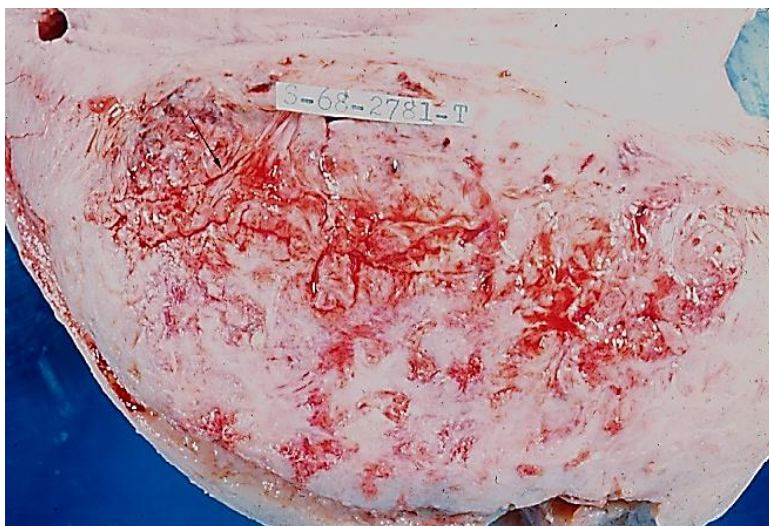


Abb. 4: Ein postoperativer Befund einer diffus- infiltrierenden Adenomyosis uteri mit Hämorrhagien (Pfeil) (Copyright der Tulane Universität. Alle Rechte vorbehalten. Web. URL: http://www2.tulane.edu/som/departments/pathology/images/Slide017_1.jpg Stand 09.11.2016).

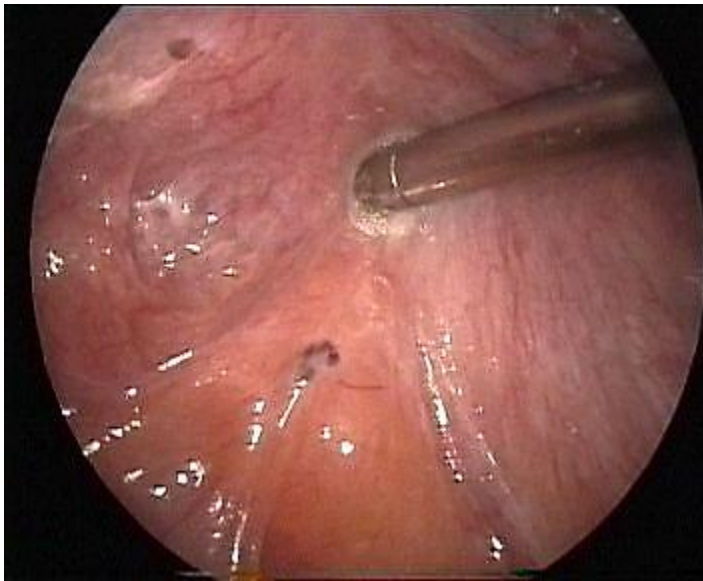


Abb. 5: Eine laparoskopische Darstellung mehrerer oberflächlicher peritonealer Endometrioseherde (Zherdev Danila Vladimirovich Web. URL: http://lapro.ru/zabolevaniya_20100809011723.html Stand 08.11.2016).



Abb. 6: Eine laparoskopische Darstellung einer rupturierten ovariellen Endometriosezyste (Zherdev Danila Vladimirovich Web. URL: http://lapro.ru/zabolevaniya_20100809011723.html Stand 08.11.2016).

Das histologische Vorhandensein von glandulären Strukturen (Epithel), endometrialem Stroma und pigmentbeladenen Makrophagen in den jeweiligen Entitäten gilt als Nachweis für die Endometriose. Meistens liegen zumindest zwei dieser Strukturen vor (Ebert 2011).

Mikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die endometriotischen Drüsen relativ ähnlich den endometrialen Drüsen bei Patientinnen sind, die von inaktiv bis proliferativ oder gelegentlich sekretorisch bis hyperplastisch reichen können (Clement 2007).

Trotzdem gibt es Erscheinungsformen, die von rein drüsigen- bis rein stromalen endometriotischen Läsionen reichen. In detaillierten Aufnahmen im Elektronenmikroskop wurden beispielweise bis zu drei Gruppen von Läsionen unterschieden (Schweppe et al. 1990). Die erste Gruppe ist durch einen hohen Differenzierungsgrad der Drüsen und des zytogenen Stromas charakterisiert. Die zweite Gruppe ist durch mehr kubisches, abgeflachtes und niedrig differenziertes Epithel gekennzeichnet, das zum größten Teil dilatierte Drüsen auskleidet. In der dritten Gruppe ist das Epithel wiederum hochdifferenziert, jedoch bestehen Ähnlichkeiten zur Tube und Zervixschleimhaut (Schweppe et al. 1990).

Ebenfalls konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass Endometrioseherde morphologisch uneinheitlich auf zyklische Hormoneinflüsse reagieren; so konnten Reaktionen von wenig intensiv, unvollständig bis zum Teil fehlend festgestellt werden (Schweppe et al. 1984).

Die endometriotischen Läsionen, die keine Drüsen haben und als eine rein stromale Endometriose bezeichnet werden (Boyle und McCluggage 2009), haben charakteristische Knötchen oder Plaques, die oberflächlich meist unterhalb des Mesothels vorzufinden sind. Diese stromale Endometriose kann isoliert sowie mit der typischen Endometriose auftreten (Boyle und McCluggage 2009).

Ebenso trifft man auf Läsionen, wo das zytogene Stroma nicht vorhanden ist und nur Drüsenformationen auftreten, wie z.B. bei postmenopausalen Frauen (Houghton und McCluggage 2011). Hier könnte die Suche nach pigmentbeladenen Makrophagen die Diagnose erleichtern, um eine Fehldiagnose wie die Endosalpingiose zu vermeiden (Houghton und McCluggage 2011). Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Mischungen von differenzierten bis hinzu undifferenzierten endometriotischen Zellen sowie rein stromale Herden, die im Zusammenhang mit der rektovaginalen Endometriose stehen (Abrao et al. 2003).

Ergänzend dazu zeigte eine andere Studie, dass sich in oberflächlichen Endometrioseherden hoch differenzierte Drüsenstrukturen finden und in der ovariellen Endometriose eine Dominanz von niedrig differenzierten und gemischten Strukturen (Kamergorodsky et al. 2009).

1.5 Pathogenese

Die Ätiologie der Endometriose ist weiterhin ungeklärt. Im Laufe der Zeit haben sich mehrere Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Endometriose entwickelt.

Eines der am weitesten verbreiteten Theoriemodelle ist die Transplantationshypothese von Sampson. Ihm hat man sogar für seine Errungenschaften den Beinamen „Vater der Endometriose“ gegeben (Clement 2001). Er hat als Erster Anfang des 20. Jahrhunderts nachweisen können, dass durch die retrograde Menstruation *vitales eutopes* Endometriumgewebe durch die Eileiter in die Bauchhöhle gelangt und sich dort implantiert und als Endometriose in Erscheinung tritt (Sampson 1925).

Des Weiteren haben Frauen mit Endometriose größere Mengen an retrogradem Menstruationsfluss als Frauen ohne Endometriose (Halme et al. 1984), was als ein Risikofaktor für die Endometriose gewertet wird (Koninckx et al. 1998).

Außerdem sieht man bei Störungen in der Embryonalentwicklung des Müller'schen-Ganges und bei zervikalen oder vaginalen Abflussbehinderungen ein erhöhtes Risiko der Endometriose zu einem früheren Zeitpunkt (Nunley und Kitchin 1980, Olive und Henderson 1987). An Tierversuchen wurde nach einer Zervix-Verengung ebenfalls ein signifikant häufigeres Auftreten von Endometrioseherden beobachtet (D'Hooghe et al. 1994, D'Hooghe 1997). Sampson vermutete ebenso eine lymphogene und hämatogene Streuung der Endometriumzellen zu ektopischen Lokalisationen außerhalb des Beckens (Sampson 1927a).

Ein anderes Erklärungsmodell ist die Theorie der Metaplasie. Die Endometrioseherde sollen sich durch undifferenzierte Zellen des Zölomepithels entwickeln (Meyer 1919, Gruenwald 1942). Gestützt wird die Theorie von dem metaplastischen Potential des pelvinen Mesothels und der Invagination des Cortex bei der ovariellen Endometriose (Nisolle und Donnez 1997). Auch aus rektovaginalen Knoten sollen durch eine Metaplasie von Müller'schen Überbleibseln endometriotische Läsionen entstehen (Nisolle und Donnez 1997).

Einige Stimuli, wie hormonelle oder immunologische Faktoren, sollen ebenfalls eine metaplastische Veränderung der normalen Zellen induzieren (Levander und Normann 1955, Merrill 1966). In diesem Zusammenhang wird auch die *Embryonic rest* Theorie gebracht; während der embryonalen Entwicklung sollen endometriale Zellen, die eigentlich in der Gebärmutter wachsen, sich in der Bauchhöhle vorfinden. Diese Zellen würden dann in der Pubertät unter den Wirkungen von Östrogen und Progesteron

aktiviert werden (Aznaurova et al. 2014).

Ein weiteres entwicklungsbiologisches Erklärungsmodell hat eine Forschergruppe aus Italien vorgestellt. Es wurden fetale Autopsieproben untersucht und ektope Endometriumzellen an prädestinierten Stellen, wie im Douglasraum und Septum rektovaginale, nachgewiesen (Signorile und Baldi 2010).

Eine neuere Hypothese, die TIAR- Theorie, (Tissue Injury and Repair) postuliert, dass Endometriose durch ein Auto-Trauma verursacht wird (Leyendecker et al. 2009).

Eine östrogengesteuerte Peristaltik des Uterus führt zu Mikrotraumata; die Mikrotraumen bedingen Gewebeschädigungen mit anschließender Reparatur unter einer lokal zunehmenden Produktion von Östrogen, die wiederum die Hyperperistaltik des Uterus anregt. Es kommt folglich zu einer Desquamation und Dislokation von basalen Endometriumzellen über die Tuben in den Bauchraum (Leyendecker et al. 2009).

Ebenso können die endometrialen Zellen das Myometrium penetrieren und sich als Adenomyose manifestieren (Leyendecker et al. 2009).

Eine andere Theorie geht davon aus, dass Stammzellen an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind (Maruyama und Yoshimura 2012); so soll es während der neonatalen Periode zu einer Ablösung von Endometriumzellen kommen, welche Stammzellcharakter haben. Diese Zellen implantieren sich dann durch einen retrograden Fluss in die Bauchhöhle und überleben langfristig als endometriale Stammzellen (Gargett et al. 2014). Unterstützt wird diese Hypothese, dass während der späten Stadien der Schwangerschaft das Endometrium des Fetus dezidualisiert und es nach der Geburt zur Desquamation kommt (Gargett et al. 2014).

In Experimenten mit Endometrioseherden konnte ebenfalls ein Nachweis von Stammzellen gezeigt werden (Chan et al. 2011). Diese Theorie greift unterstützend Sampsons Prinzip der retrograden Menstruation auf.

Weitere Ansätze die zur Klärung des Pathomechanismus beitragen, sind hormonelle, oxidative, genetische und immunologische Faktoren. Es konnte in experimentellen Untersuchungen gezeigt werden, dass endometriotische Läsionen vermutlich vom Hormon Östrogen abhängig sind. Östrogen fördert durch mitogene Eigenschaften die Erhaltung und das Wachstum in der Endometriose (Gurates und Bulun 2003). Auf der anderen Seite stellt das Hormon Progesteron eine gegensätzliche Funktion auf die Endometrioseherde dar; es antagonisiert die mitogene Wirkung von Östrogen in der Endometriose (Gurates und Bulun 2003). Außerdem enthalten die endometriotischen Läsionen Östrogenrezeptoren sowie das Enzym Aromatase, das die Umwandlung von

Androgenen zu Östrogenen katalysiert (Kitawaki et al. 2002). Weiterhin unterscheiden sich die Expressionsmuster der Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren in der Endometriose von denen des eutopen Endometriums (Kitawaki et al. 2002).

Studien legen nahe, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Endometriose besteht. Der oxidative Stress entsteht durch das Vorhandensein von erhöhten Konzentrationen freier Radikale und der Abwesenheit oder Reduktion von Antioxidantien (Gupta et al. 2006). Es wurde ein Ungleichgewicht zu Gunsten freier Radikale in Endometriosepatientinnen vorgefunden (Murphy et al. 1998, Szczepanska et al. 2003).

Eine genetische Präposition wird auch immer wieder in Verbindung mit der Endometriose gebracht. Es werden stets Fälle gefunden, bei denen eine familiäre Häufung mit erhöhten Risiko bei Menschen mit einem betroffenen Verwandten ersten Grades einhergehen (Seli et al. 2003). Auch bei eineiigen Zwillingen konnte ein vermehrtes Auftreten von Endometrioseherden festgestellt werden, die ebenfalls eine genetische Komponente in Betracht ziehen (Hadfield et al. 1997). Ein weiteres Merkmal in diesem Zusammenhang ist das Vorkommen unterschiedlicher Gen- und Proteinexpression zwischen Patienten mit und ohne Endometriose (May et al. 2011). Beobachtungen zeigen, dass Autoimmunerkrankungen gehäuft bei Frauen mit Endometriose auftreten. Es besteht die Möglichkeit, dass die Pathogenese der Endometriose auf eine fehlerhafte Immunantwort in Zusammenhang gebracht wird (Sinaii et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass in Endometriosepatientinnen die eutopen Endometriumzellen gegenüber den natürlichen Killerzellen deutlich resistenter sind als bei Patientinnen ohne Endometrioseherde (Burney und Giudice 2012). Es konnte auch eine Zytokinerhöhung in der Endometriose festgestellt werden. Die Typ2-T- Helferzellen unterdrücken in der Peritonealflüssigkeit die zellvermittelte Immunität durch die Erhöhung der Sekretion von IL- 4 und IL- 10 (Hsu et al. 1997). Eine weitere Dysregulation des Immunsystems, welche bei Endometriosepatientinnen festgestellt werden konnte, ist eine Autoantikörper- Produktion durch die B- Lymphozyten (Osuga et al. 2011). Ebenso entstehen lokale Entzündungsreaktionen, indem Makrophagen und Leukozyten rekrutiert werden, die wiederum durch die Verschleppung von Endometriumzellen in die Bauchhöhle begünstigt werden (Kyama et al. 2009). Das sind die bis dato wichtigsten, diskutierten ätiologischen Erklärungsmodelle zur Endometriose.

1.6 Klinik, Diagnostik und Therapie

Die Endometriose kann für sehr unterschiedliche Symptome verantwortlich sein, welche die Diagnose häufig erschweren. Bei einigen Frauen ist die Symptomatik besonders ausgeprägt und wiederum andere Frauen zeigen keine Symptome (Farquhar 2007). Ebenso zeigt sich oft keine Korrelation zwischen der Symptomatik und der Größe der endometriotischen Läsionen (Farquhar 2007).

Die typischen Symptome der Endometriose sind Dysmenorrhoe (schmerzhafte Regelblutung), Schmerzen im Beckenbereich ohne Bezug zum Menstruationszyklus, Dyspareunie (schmerzhafter Geschlechtsverkehr), Dyschezie (schmerzhafter Stuhlgang) und Dysurie (schmerzhaftes Wasserlassen) (Ballard et al. 2006). Für viele Frauen können die Schmerzen so stark sein, dass sie für durchschnittlich 18 Tage im Jahr bettlägerig sind, wobei sich die Symptome im Laufe der Zeit oft verschlechtern können. Tatsächlich führen die Chronifizierung und die Schwere der Endometriose- abhängigen Schmerzen häufig zu einer erheblichen Verschlechterung der Lebensqualität und einer hohen psychologischen Morbidität (Ballard et al. 2006).

Eine Subfertilität ist ebenfalls häufig mit der Endometriose verbunden (Ballard et al. 2006). Es kommen vermutlich mechanische Faktoren als Ursache in Frage, wie beispielsweise Verwachsungen der Adnexe (Malik und Vogt 2009).

Die Symptome überlappen sich häufig mit denen anderer gynäkologischer Erkrankungen, wie z.B. *pelvic inflammatory disease*, Adhäsionen im Beckenbereich, Ovarialzysten und Leiomyome; auch gastrointestinale oder urologische Erkrankungen wie z.B. das Reizdarmsyndrom, die interstitielle Zystitis und entzündliche Darmerkrankungen müssen in Betracht gezogen werden (Giudice 2010).

Es wird geschätzt, dass die Patientinnen nach dem Auftreten der ersten Symptome bis letztendlich die gesicherte Diagnose Endometriose gestellt wird, durchschnittlich 7 bis 8 Jahre vergehen können (Falcone und Lebovic 2011).

Bei der Diagnostik der Endometriose ist zwischen nicht- invasiver Diagnostik und invasiver Diagnostik zu unterscheiden.

Zur nicht- invasiven Diagnostik gehören ausführliche Anamnese, gynäkologische Untersuchung mit Inspektion, SpekulumEinstellung, vaginale- und rektovaginale Palpation, Ultraschall und MRT- Untersuchung (Schindler 2007).

Der transvaginale Ultraschall ist eine nützliche Methode zur Diagnose der ovariellen Endometriose, vorausgesetzt der Durchmesser ist größer als 2 cm (Brosens et al. 2004).

Da der transvaginale Ultraschall eine kostengünstige Bildgebung darstellt, sollte sie als bevorzugte Methode zur Diagnose der ovariellen Endometriose Anwendung finden (Brosens et al. 2004).

Mit einem weiteren bildgebenden Verfahren, der MRT, werden sehr gute diagnostische Informationen erhoben, besonders für die tief infiltrierende Endometriose im Bereich der Blase, des Harnleiters, retrocervical, rektosigmoidal und der Vagina (Chamie et al. 2009). Jedoch haben die bildgebenden Verfahren Sonographie und MRT ihre Limitation im Erkennen von peritonealen Läsionen und Adhäsionen (Giudice 2010).

Ebenso wurden große Bemühungen nach der Suche von nicht- invasiven Methoden vorgenommen, wie beispielsweise Biomarker (CA- 125 und IL- 6) im Serum, die jedoch nur eine unzureichende Evidenz aufweisen (Nisenblatt et al. 2016).

Deshalb gehört nach wie vor zum Goldstandard für die Diagnose der Endometriose die invasive- laparoskopische Untersuchung mit histologischer Sicherung (Brosens et al. 2004, Garry 2004). Der große Vorteil der laparoskopischen Untersuchung liegt darin, dass man zeitgleich nach der Blickdiagnose die Therapie starten kann, indem man die vorhandenen endometriotischen Läsionen entfernt. Allerdings ist nach wie vor nur eine symptomorientierte Behandlung mit dem Ziel der Linderung möglich.

Man kann verschiedene Therapieoptionen anwenden; zum einen gibt es die Möglichkeit einer medikamentöse Therapie zum anderen gibt es eine chirurgischen Therapie, oder eine Kombination aus beiden Optionen.

Die am häufigsten verwendete Medikamentengruppe bei Endometriosepatientinnen in der Praxis sind Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAP) als *First-Line*- Behandlung bei Schmerzen. Sie haben nur geringe Nebenwirkungen bei kurzzeitiger Anwendung und sind zudem frei verkäuflich. NSAP (einschließlich COX 2- Inhibitoren) hemmen die Prostaglandin- Produktion. Prostaglandine sind lokal produzierte Stoffe, die vermutlich für die Schmerzen bei der Endometriose verantwortlich sind (Allen et al. 2009).

Jedoch konnte in einer Cochrane- Untersuchung keine eindeutige Wirksamkeit in Bezug auf die Schmerzreduktion im Zusammenhang mit der Endometriose gezeigt werden, mit dem Hinweis, dass NSAP bei langfristiger Einnahme mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind (Allen et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnte eine spätere Cochrane- Analyse aus dem Jahr 2015 eine deutliche Schmerzreduktion bei Einnahme von NSAP bei ca. 30% der Frauen mit primärer Dysmenorrhoe zeigen (Marjoribanks et al. 2015).

Ein weiterer medikamentöser Ansatz zur Symptomlinderung ist die hormonelle Therapie mit oralen Kontrazeptiva, Gestagenen und den Gonadotropin-Releasing-

Hormon- Analoga (GnRH- Analoga). Man verfolgt mit diesen Medikamenten das Ziel einer Supprimierung der Östrogenproduktion in den Ovarien, da Östrogen mit dem Wachstum der endometriotischer Läsionen in Verbindung gebracht wird (Rudzitis-Auth et al. 2016).

Die oralen Kontrazeptiva sind eine häufig verordnete Medikamentengruppe, die als Medikamente erster Wahl bei Dysmenorrhoe verwendet werden, auch besonders bei Patientinnen mit Endometriose. Auch hier ist die Datenlage nicht eindeutig, es finden sich nur wenige Studien mit ausreichender Evidenz zur Wirksamkeit der oralen Kontrazeptiva bei Endometriose (Harada et al. 2008). Einige Studien vermuten, dass orale Kontrazeptiva die apoptotische Aktivität des Endometriums der Frauen mit Endometriose erhöhen und darüber hinaus zu Anovulation, Dezidualisierung und Amenorrhoe (Ausbleiben der Regelblutung) führen (Vercellini et al. 2003).

Eine weitere hormonelle Therapie sind die reinen Gestagenpräparate, wie z.B. Dienogest, die alternativ zu den oralen Kontrazeptiva verwendet werden. Die Gestagene zeigen eine wirksame Reduktion der Schmerzen bei Endometriosepatientinnen (Strowitzki et al. 2010), jedoch ist die Einnahme mit mehreren Nebenwirkungen (Menstruationsstörungen, Amenorrhoe, Gewichtszunahme) verbunden (Zito et al. 2014). Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt, jedoch vermutet man eine Dezidualisierung des endometrialen Gewebes mit einer eventuellen Atrophie. Dies ist vermutlich auf eine direkte suppressive Wirkung von Gestagenen auf die Östrogenrezeptoren des Endometriums zurückzuführen (Olive 2003). Außerdem wird ein weiterer Wirkmechanismus auf molekularer Ebene vermutet, nämlich eine Unterdrückung von Matrixmetalloproteinasen, die mit der Implantation und Wachstum der ektopen endometriotischen Läsionen in Verbindung gebracht werden (Olive 2003). Die letzte zu erwähnende hormonelle Therapie sind die GnRH- Analoga. In mehreren randomisierten Studien mit einer Gesamt- Patientenanzahl von 1821 Frauen konnte eine deutliche Verbesserung der Schmerzen bei Dysmenorrhoe mit der Einnahme von GnRH-Agonisten erreicht werden (Giudice 2010). Die GnRH- Agonisten unterdrücken effektiv die endogene Gonadotropinsekretion und führen zu einem hypoöstrogenen Zustand (Lee et al. 2016). Der große Nachteil der GnRH- Agonisten sind die Nebenwirkungen im Zusammenhang mit dem induzierten Östrogenmangel (Lee et al. 2016). Es kann zu einer Verringerung der Knochenmineraldichte kommen, sowie zu Hitzewallungen, emotionaler Labilität, Schlaflosigkeit, Verlust der Libido und vaginaler Trockenheit; deshalb ist die Einnahme von GnRH- Agonisten auf maximal sechs

Monate begrenzt (Vercellini et al. 2008). Aus diesen Gründen wird eine *add- back*-Therapie empfohlen, welche verschiedene pharmakologische Wirkstoffe mit einem GnRH- Analoga kombiniert, um die hypoöstrogenen Nebenwirkungen zu minimieren und die Compliance der Patientinnen zu verbessern (Surrey 2010).

Falls es durch die medikamentöse Therapie nicht zu einer Linderung der Beschwerden kommt, ist die Option einer chirurgischen Therapie zu erwägen. Zum Goldstandard der operativen Therapie gehört die laparoskopische Entfernung der endometriotischen Läsionen durch Exzision oder Ablation, um die Schmerzen wirksam behandeln zu können (Johnson und Hummelshoj 2013). Der Vorteil der minimal- invasiven laparoskopischen Technik gegenüber der Laparotomie sind die geringeren postoperativen Schmerzen und eine schnellere Erholungszeit der Patienten (Mais et al. 1996); jedoch wird auch in einigen Fällen, beispielsweise bei endometriotischen Ovarialzysten, eine offene laparotomische Technik bevorzugt aufgrund der besseren Resektion von Endometrioseherden (Tanprasertkul et al. 2015). Trotz des Goldstandards der laparoskopischen Behandlung für die Endometriose ist immer noch mit einer hohen Rate an Rezidiven zu rechnen (Vlek et al. 2016), vermutlich wegen der nach wie vor vorhandenen retrograden Menses. Es konnte gezeigt werden, dass bei Frauen nach operativen Eingriffen durch die Einlage z.B. eines Levonorgestrel- freisetzenden Intrauterinpessar deutlich weniger Rezidiv- Raten auftraten (Abou-Setta et al. 2006), möglicherweise aufgrund der Reduktion der Menses durch die mechanische Barriere.

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die pathologischen Mechanismen der Endometriose, welche zu einer der häufigsten benignen Erkrankungen der Frau gehört, sind weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Die Schwierigkeit für das Verständnis der Endometriose liegt in den drei unterschiedlichen Erscheinungsbildern: Sind die jeweiligen endometriotischen Entitäten (DIE, Peritoneum und Ovar) aus einem Pathomechanismus entstanden oder hat jede endometriotische Entität einen unterschiedlichen Pathomechanismus?

Solange die genaue Ätiologie der Endometriose nicht verstanden ist, wird sie ein klinisches und ökonomisches Problem für die Bevölkerung darstellen, welches immer noch deutlich unterschätzt wird.

Um einen Beitrag an der aktuellen Forschung der Endometriose zu leisten, versuchen wir mit unseren Untersuchungen ein besseres Gesamtverständnis zu bekommen.

Die experimentelle Studie legt den Fokus auf die Expression von Proteinen im Endometrium und in der Endometriose; in den epithelialen Drüsen im Endometrium und in den endometriotischen Drüsen bzw. Zysten. Es wird immunhistochemisch mit gewebspezifischen Proteinen im Endometrium und den endometriotischen Entitäten DIE, Peritoneum und Ovar versucht, mögliche Übereinstimmungen und Unterscheidungen zu finden.

Es wird möglichst viel Wert darauf gelegt, Serienschnitte zu verwenden, um eine methodisch hohe Validität zu gewährleisten. Zuerst soll erreicht werden, dass die gewebspezifischen Marker eine möglichst hohe Expression in den epithelialen Drüsenzellen des Endometriums aufweisen. In diesem Kontext werden gewisse Kriterien aufgestellt, wie beispielsweise eine höchstmögliche Anzahl an gefärbten Epithelzellen, wenige stromale Zellfärbungen und ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis.

In weiteren Analysen werden die einzelnen gewebspezifischen Biomarker nach ihrer Expression in den jeweiligen endometriotischen Entitäten (DIE, Peritoneum und Ovar) kategorisiert und die Entitäten klassifiziert, die letztendlich statistisch ausgewertet werden.

Die Haupthypothese beschäftigt sich damit, ob diese gewebspezifischen zellbiologischen Marker in endometrialen Drüsen wie auch in den anderen endometriotischen Entitäten (DIE, Peritoneum und Ovar) ein einheitliches Expressionsmuster aufzeigen oder ob sie sich in ihren Eigenschaften grundlegend voneinander unterscheiden.

Mit der Klassifikation der Proteinexpression in den epithelialen Drüsen im Endometrium und in den endometriotischen Entitäten erhoffen wir uns, Antworten darauf zu bekommen, inwiefern die endometriotischen Läsionen aus einem gemeinsamen, monoklonalen Ursprung, dem Endometrium abgeleitet werden können. Die möglich ätiopathologischen Konsequenzen können eventuell als Grundlage genutzt werden, um neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

3. Material und Methode

3.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Im Rahmen der experimentellen Studie konnten wir auf die Endometriosedatenbank aus dem Forschungslabor der Frauenheilkunde der Justus-Liebig Universität zurückgreifen. Die Patientinnen, welche aus der Datenbank einbezogen wurden, wiesen verschiedenartige endometriotische Läsionen auf. Es standen uns ebenfalls Gewebe von Frauen aus Uteri ohne Endometriose und ohne Menopause zur Verfügung. Alle Proben wurden entweder durch Hysterektomie bei den Uteri oder laparoskopisch bei den anderen endometriotischen Läsionen gewonnen. Bei Patientinnen, welche eine DIE aufwiesen, wurden diese Befunde nach dem ENZIAN- Score (Haas et al. 2013b) erfasst. Es wurden Gewebeproben aus Uterus, Ovar, Peritoneum und der tief infiltrierenden Endometriose untersucht. Die DIE lag überwiegend rektovaginal und rektosigmoidal vor. Wir kamen auf folgende Patientenzahl 33 Uteri, davon 10 mit Adenomyosen, 19 Ovarien, 19 peritoneale Endometriosen und 19 tief infiltrierende Endometriosen, welche immunhistochemisch analysiert wurden. Aus diesen Gewebeproben wurden 3 Uteri, 2 Ovarien und 7 tief infiltrierende Endometriosen aus speziellen Tissue-Arrays (Provitro Berlin Cat.-Nr. 4012210) und Fertigpräparaten (Provitro Berlin Art.-Nr. 9052213) mit einbezogen, um die Quantität zu erhöhen.

Die Gesamtsumme aller verwertbarer Gewebeproben waren 23 Uteri ohne Endometriose, 10 Adenomyosen, 19 ovarielle Endometriosen, 30 peritoneale Endometriosen und 20 DIE. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 19 und 63 Jahren. Das positive Votum der Ethikkommission der Justus-Liebig Universität mit dem Aktenzeichen 95/09 liegt vor.

Die Gewebeproben stammen aus operativen Eingriffen von der Frauenklinik der Justus-Liebig Universität. Die Probandinnen gaben zu Forschungszwecken ihr schriftliches Einverständnis.

3.2 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein experimentelles Verfahren, welches in der Diagnostik und Forschung weit verbreitet ist. Das Prinzip besteht darin, auf Gewebeschnitten Antigene mittels spezifischer Antikörper zu detektieren und diese mit einem Färbeverfahren sichtbar zu machen. Das Wort „Immunhistochemie“ setzt sich aus drei Silben zusammen und spiegelt das Verfahren wider. Immun von der Immunologie abgeleitet, steht für die Antikörper/Antigen- Bindung. Histo von der Histologie abgeleitet, steht für das Gewebe, welches als Ausgangsmaterial fungiert und mit dem Lichtmikroskop analysiert wird. Das Wort „Chemie“ bedeutet in diesem Fall eine oxidative Reaktion in Form einer Farbstoffentstehung durch eine enzymatische Reaktion.

Das Bindungsverhalten eines Antikörpers ist abhängig von der Lokalisation des Antigens. Man kann drei Lokalisationsmuster unterscheiden, die auch als Mischformen vorzufinden sind: Antigene, die sich im Zytoplasma der Zellen befinden; Antigene, welche nur im Kern der Zellen eine Farbreaktion ermöglichen; und die dritte Lokalisation die sich wie eine netzartige Struktur darstellt, kann auf der äußeren Membran vorgefunden werden (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Bei der Detektion kann man zwei Methoden unterscheiden, die sogenannte direkte Methode und die indirekte Methode. Beim ersten Prinzip bindet der markierte Antikörper das Antigen direkt. Hierbei handelt es sich um eine hoch- affine Anziehung. Der Antikörper ist mit einem Markerenzym wie z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase konjugiert. Das Prinzip besteht darin, dass dem Enzym ein Substrat angeboten wird, welches unter Bildung eines sichtbaren Farbstoffs durch das Enzym umgesetzt wird. Alternativ kann man auch fluoreszierende Farbstoffe benutzen.

Bei der indirekten Methode wird von einem nicht markierten Antikörper das Antigen gebunden und zusätzlich ein zweiter konjugierter Antikörper dazugeben, welcher dann am Fc-Teil des primären Antikörpers zur Detektion dient. Dieser ist mit einem Markerenzym oder Fluorochrom konjugiert. In der gegenwärtigen Praxis hat sich die indirekte Methode gegenüber der direkten etabliert. Einige Gründe hierfür sind, dass das Farbsignal der direkten Methode schwächer ist und die Konjugation des Primärantikörpers aufwendiger und kostenintensiver ist. Ebenfalls muss für jedes Antigen ein spezifischer Antikörper mit der Detektionsmethode bereitstehen (Noll und

Schaub-Kuhnen 2000). Mittlerweile gibt es eine Reihe von modifizierten Methoden der indirekten Immunhistochemie für konkrete Fragestellungen. Zurzeit sind Polymer-basierte Verstärkersysteme in Mode (s. folgendes Kapitel).

3.2.1 Immunhistochemie nach der Envision™-Methode

Seit einigen Jahren hat die Firma Dako eine Methode in der Immunhistochemie auf den Markt gebracht, welche im Forschungslabor der Gynäkologie JLU- Gießen ebenfalls Anwendung findet. Hierbei kommt es zu einer Weiterentwicklung im Bereich der technischen Komponenten, sowie eine Beschleunigung bzw. eine Steigerung der Sensitivität im immunhistochemischen Verfahren (Belling et al. 1999). Die Methode basiert auf einem Polymer-Gerüst und trägt den Namen EnVision™-System. Es handelt sich ebenso um eine indirekte Methode mit zwei Schritten. Genau wie bei den anderen Methoden gibt man zuerst den unkonjugierten Primärantikörper auf das Gewebepräparat. Der zweite Schritt ist das Zufügen des Polymerkonjugats, welches aus einem Dextrangerüst mit ungefähr 15 Sekundärantikörpern und durchschnittlich 100 Enzymmolekülen ausgestattet ist (Kammerer et al. 2001).

Das EnVision™-System verfügt über sekundäre Antikörper, die aus Anti-Maus-Ig und Anti-Kaninchen-Ig bestehen. Ein Vorteil des polymerbasierten EnVision™-Systems gegenüber den auf Biotin- basierenden Methoden ist, dass sie weniger zu falsch-positiven Ergebnissen führen, weil das endogene Biotin mit dem EnVision™-System keine Reaktion eingeht (Vyberg und Nielsen 1998). Somit wird die Hintergrundfärbung reduziert. Ebenfalls können höhere Verdünnungen der primären Antikörper vorgenommen werden. Dies ermöglicht nachhaltig, die Kosten für die Antikörper zu senken (Sabattini et al. 1998).

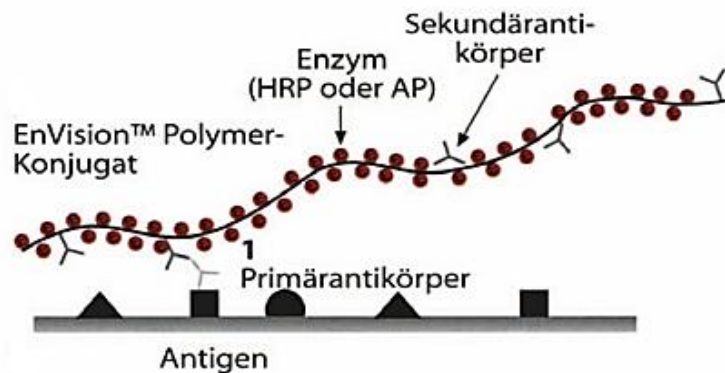


Abb. 7: Schema, welches das EnVision™-System mit dem Polymer und den daran gekoppelten Enzymen und Sekundärantikörpern darstellt (Kutzner und Palmedo 2003).
 HRP= Horseradish (Meerrettich) Peroxidase AP= Alkalische Phosphatase

3.2.2 Vorbehandlung der Gewebeproben

Einige der Gewebeproben wurden uns in Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut der Justus- Liebig Universität bereitgestellt. Der überwiegende Teil der Gewebeproben wurde aus dem Operationssaal der Frauenklinik gewonnen. Diese Gewebeproben wurden im Forschungslabor der Gynäkologie anschließend in kleine Teilstücke geschnitten, die die Maße von 5x 5mm nicht überschreiten durften. Diese Gewebestücke wurden in Falcon Röhrchen mit dem Fixiermedium Bouin meist für einige Tage unter Drehen im Abzug gelagert. Eine Nachbehandlung erfolgte über 1 bis 2 Tage mit 70% Alkohol, in dem die Gewebeproben gewaschen wurden. Nach dieser Gewebebehandlung wurden die Proben in Zusammenarbeit mit der Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität in einem Einbettautomaten (Leica TP1050) zu Paraffinblöcken verarbeitet. Das Gewebe wurde in diesem Automat zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe und durch Xylol entwässert, um es paraffingängig zu machen. Anschließend wurden die Gewebestücke in Paraffin eingebettet (Tab. 2). Die in Paraffin durchtränkten Stücke wurden abschließend mit heißem Paraffin übergossen und zu einem Wachsblock abgekühlt.

Tab. 2: Arbeitsprotokoll des Paraffineinbettungsautomaten Leica TP1050.

Laborschritt	Stoff	Voraussetzung	Zeit
Entwässern	Ethanol 80%	Raumtemperatur	1x 2Std.
Entwässern	Ethanol 96%	Raumtemperatur	1x 2Std.
Entwässern	Ethanol 100%	Raumtemperatur	3x 3Std.
Entalkoholisieren	Xylol	Raumtemperatur	1x 1Std.
Entalkoholisieren	Xylol	Raumtemperatur	2x 45Min.
Einbetten	Paraffin	59°C	3x 40Min.

3.2.3 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die ausgewählten Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms in 2-5 µm dünne Paraffinschnitte geschnitten und in ein Wasserbad mit 37°C überführt. Die Paraffinschnitte wurden dann stufenweise mit einem feinen Pinsel vom Wasserbad auf speziell beschichtete Objektträger (R. Langenbrink) aufgebracht.

Anschließend wurden die fertig bezogenen Objektträger in einem Inkubator auf 40°C über Nacht getrocknet. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen gelagert und bei Bedarf weiterverwendet.

3.2.4 Entparaffinierung

Die folgenden verwendeten Chemikalien und Lösungen sind detailliert unter dem Punkt Materialien aufgelistet. Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger zuerst in Neoclear 20 Minuten in einem Inkubator belassen, welcher auf 40°C vorgewärmt war. Anschließend wurden die Objektträger unter dem Abzug jeweils für weitere 2x 20 Minuten in Neoclear gestellt, um das Paraffin komplett zu entfernen. Der nächste Schritt war die Rehydratation in absteigender Alkoholreihe: 2x 5 Minuten in 100% Ethanol, danach 2x 5 Minuten in 96% Ethanol und zuletzt 2x 5 Minuten in 70% Ethanol. Abschließend wurden die Objektträger in destilliertem Wasser für 5 Minuten auf einem Schüttler gespült.

3.2.5 Antigendemaskierung

Durch die zuvor durch Paraffin und Gewebefixierungsmittel behandelten Gewebeproben kann es zu unspezifischen Quervernetzungen sowohl inter- als auch intramolekular kommen, weshalb der Primärantikörper nicht an das zugehörige Epitop binden kann. Insofern werden diese Bindungen mit einem Citratpuffer pH 6 demaskiert. Alternativ wird bei einem Marker auch ein Citratpuffer pH 9 verwendet. Der Citratpuffer wird zuvor 20 Minuten in einem Gourmetgarer erhitzt, danach werden die Objektträger in dem vorgewärmten Citratpuffer für weitere 20 Minuten gekocht. Anschließend werden die Objektträger in dem Citratpuffer 20 Minuten lang bei Raumtemperatur abgekühlt. Bevor es zur Blockierung mit dem Wasserstoffperoxid- Methanol Gemisch kommt, werden die Gewebeschnitte insgesamt 3x 5 Minuten mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) auf einem Schüttler gespült.

3.2.6 Blockierung und Absättigung

Einige Zell- oder Gewebearten enthalten eine endogene Peroxidaseaktivität, die trotz der Fixierung noch erhalten bleibt.

Die Meerrettich Peroxidase, welche am EnVision™ Polymer- Konjugat gekoppelt ist, reagiert mit dem Substratpuffer-Chromogen-Gemisch, welches Wasserstoffperoxid enthält. Da die endogene Peroxidase ebenfalls mit dem Wasserstoffperoxid des Substratpuffers reagieren kann und es so zu einer falsch- positiven Färbung kommt, wird die endogene Peroxidase schon vorher mit Wasserstoffperoxid blockiert. Im nächsten Schritt werden unspezifische Bindungen zwischen den Antikörpern und ungewünschten Proteinen reduziert. Mit Rinderserumalbumin (BSA) werden alle unspezifischen und spezifischen Proteine durch eine gleichmäßige Schicht abgesättigt. Die Antikörper verdrängen die schwach affine Bindung an den gewünschten Proteinen durch ihre höhere Affinität zu diesen. Zusätzlich wird Triton-X 100 als Detergenz benutzt.

Man schüttelt die Gewebeproben 30 Minuten in einem Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Methanol (45ml eiskaltes Methanol + 5ml 3% H₂O₂). Anschließend werden sie wieder 3x 5 Minuten in PBS gereinigt. Nun werden die Objektträger 20 Minuten mit BSA plus Triton X-100 (1g BSA auf 70ml PBS + 21µl Triton X-100) auf dem Schüttler gesättigt. Danach werden sie wieder 3x jeweils für 5 Minuten in PBS gespült.

3.2.7 Immunhistochemische Färbungen

Bevor man nun den Primärantikörper auf den Gewebeschnitt gibt, muss man bereits eine Antikörperverdünnung in Vorversuchen ermittelt haben, um so eine optimale Konzentration mit der besten Detektion und einem akzeptablen Signal- zu- Rauschverhältnis zu erhalten. Die Antikörper müssen vorher auf Eis aufgetaut und mit dem Antibody Diluent (Dako, Hamburg) verdünnt werden. Die überschüssige Flüssigkeit auf dem Objektträger wird auf Zellstoff entfernt und vorsichtig an den Seiten trocken gewischt. Im Folgenden werden die Gewebeschnitte mit einem PAP-Pen (Dako) eingekreist, damit die Antikörperlösung nicht vom Objektträger abfließen kann. Wichtig ist es, die Schnitte in eine feuchte Kammer zu legen, damit ein Austrocknen verhindert wird. Dazu wird pro Reihe ein befeuchtetes Filterpapier in eine Inkubationskammer gelegt. Nun pipettiert man den speziellen Primärantikörper auf den Gewebeschnitt (Tab. 4/ 5). Dabei ist darauf zu achten, dass die Primärantikörperlösung vollständig das Gewebe benetzt, um so später keine falsch- negativen Ergebnisse zu erhalten. In der Regel genügen pro Schnitt 100 µl, manchmal aber auch mehr je nach Gewebegröße, wie bei den ovariellen Gewebeproben. Beim nächsten Schritt werden die Schnitte über Nacht in einem Kühlschrank (4°C) inkubiert. Am nächsten Tag lässt man die Gewebeschnitte mit der Primärantikörperlösung auf Zellstoff ablaufen und spült die Schnitte 3x 5 Minuten mit PBS auf einem Schüttler. Es folgt nun die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Polymer (Dako, Hamburg) konjugiert an die jeweiligen Anti-Spezies Immunglobuline für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgt wieder das Abtropfen auf ein Stoffpapier und das dreimalige Waschen je 5 Minuten mit PBS. Die Substrat- Chromogen- Lösung (Dako, Hamburg) wird unter einem Abzug hergestellt. Dazu mischt man 1 ml Substratpufferlösung pH 7,5, das Wasserstoffperoxid und ein Konservierungsmittel enthält, mit 1 Tropfen 3,3 Diaminobenzidinchromogenlösung (DAB Dako, Hamburg). Diese Mischung reicht für ungefähr 10 Schnitte. Wichtig ist, dass die Mischung abgedunkelt gelagert und innerhalb von 5 Tagen aufgebraucht wird. Wegen des kanzerogenen Risikos der Substanz muss ebenfalls während des Kontakts mit dem DAB-Gemisch eine Atemschutzmaske getragen und mit Nitril-Handschuhen gearbeitet werden.

Um die Gewebeproben wird mit einem Zellstoffpapier vorsichtig Flüssigkeit weggewischt und das DAB- Gemisch unter dem Abzug darauf pipettiert. Die Inkubationszeiten des DAB- Gemisch variieren von Entität zu Entität und von Antigen

zu Antigen. Es wird unter ständiger Sicht unter dem Mikroskop die optimale Farbintensität mit der minimalen Hintergrundfärbung bestimmt. Man muss darauf achten, dass sich der Schnitt nicht zu braun färbt. Die Zeit wird mittels einer Stoppuhr bestimmt und gilt dann auch für alle weiteren Schnitte. Wenn der gewünschte Färbegrad des Gewebes erreicht ist, wird das DAB-Gemisch auf ein Zellstofftuch abgetropft und in einer speziellen Giftmülltonne entsorgt. Die Schnitte werden nun in destilliertes Wasser gestellt und jeweils 3x 5 Minuten auf einem Schüttler gewaschen. Es folgt die Gegenfärbung mit Haemalaun nach Mayer, um die übrigen Zell- und Gewebestrukturen darzustellen. Insbesondere werden die basophilen Strukturen, wie die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA, blau gefärbt. Jeder Schnitt wird für 30 Sekunden gefärbt und dann in destilliertes Wasser gestellt. Danach werden die Proben für 10 Minuten in einer Küvette unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Präparate werden als nächstes durch eine Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration entwässert; die Zeiten sind 2x 2 Minuten mit 70% Ethanol, 2x 2 Minuten mit 96% Ethanol und 2x 2 Minuten mit 100% Ethanol. Nun folgt das Bad in Xylol, um das Ethanol herauszuwaschen; zuerst 1x 2 Minuten und dann 1x 5 Minuten. Der letzte Schritt ist das Eindecken der Objektträger mit Eukitt. Hierbei taucht man einen Glasstab in die Flasche mit Eukitt und gibt je nach Größe des Gewebes ein bis zwei Tropfen darauf. Dann legt man das Deckgläschen darüber und drückt mit einer Pinzette die noch darunter befindliche Luft nach außen. Die eingedeckten Präparate werden unter den Abzug gestellt, bis sie trocken sind. Anschließend werden kleine quadratische Bleigewichte auf die eingedeckten Schnitte gelegt für den Fall, dass noch kleine Luftblasen vorhanden sind.

3.2.8 Arbeitsprotokoll Immunhistochemie

Tab. 3: Arbeitsprotokoll nach der EnVision™- IHC.

Laborschritt	Stoff	Voraussetzung	Zeit
Entparaffinieren	Neoclear	40°C Inkubator	1x 20Min.
		Raumtemperatur, Abzug	2x 20Min.
Dehydrieren	Ethanol: 100%,	Absteigende Alkoholreihe,	Jeweils
	96%, 70%	Abzug	5Min.

Spülen	Destilliertes Wasser	Schüttler, Küvette	1x 5Min.
Antigene freilegen	Citratpuffer pH 6	Dampfgerar vorgewärmt	1x 20Min.
Abkühlen	Citratpuffer	Raumtemperatur	1x 20Min.
Waschen	PBS	Schüttler, Küvette	3x 5Min.
Blockierung	H ₂ O ₂ -Methanol Gemisch	Schüttler, Küvette mit Deckel	1x 30Min.
Waschen	PBS	Schüttler, Küvette	3x 5Min.
Absättigung	BSA-PBS- Triton X100 Gemisch	Schüttler, Küvette	1x 20Min.
Inkubieren	Primärantikörper	Feuchtekammer, Kühlschrank 4°C	Über Nacht
Waschen	PBS	Schüttler, Küvette	3x 5Min.
Inkubieren	Labelled Polymer-HRP- Anti- Spezies	Feuchtekammer, Raumtemperatur	1x 30Min.
Waschen	PBS	Schüttler, Küvette	3x 5Min.
Detektieren	DAB- Gemisch	Abzug, mikroskopieren	Individuell
Spülen	Destilliertes Wasser	Küvette	3x 5Min.
Gegenfärben	Haemalaun nach Meyer	Feuchtekammer, Abzug	Jeweils 30Sec.
Bläuen	Fließendes Leitungswasser	Waschbecken, Küvette	1x 10Min.
Entwässern	Ethanol: 70%, 96%, 100%	Aufsteigende Alkoholreihe, Abzug	Jeweils 2Min.
Entalkoholisieren	Xylol	Abzug	1x 2Min. 1x 5Min.
Eindecken	Eukitt	Abzug, Lufteinschluss verhindern	

3.3 Beschreibung und Eigenschaft der getesteten Antikörper

3.3.1 Antikörper β - Sarcoglykan

Der verwendete primäre Antikörper β - Sarcoglykan (Abcam ab55683) ist ein monoklonaler Mausantikörper, welcher bei einer Temperatur von -20°C gelagert wird. Die optimale Verdünnung mit dem Antibody Diluent (Dako, Hamburg), bestehend aus TRIS HCl- Puffer, ist 1:100. Man nimmt pro Objektträger $1\mu\text{l}$ β - Sarcoglykan und mischt es mit $99\mu\text{l}$ Antibody Diluent mittels Vortex. An das Peroxidase-markierte Polymer sind Ziegen Anti-Maus Immunglobuline in TRIS-HCl-Puffer konjugiert (Dako, Hamburg). Der Polymer- konjugierte Antikörper muss die passende Spezies zum Primärantikörper besitzen. Für alle weiteren Antikörper gilt die gleiche Vorgehensweise. Beta- Sarcoglykan ist auf drei Entitäten der Endometriose und auf dem Endometrium getestet worden. Die Einwirkzeiten des Substrat- Chromogen Gemischs (Dako, Hamburg) sind wie folgt (Tab. 5).

Tab. 4: Stammdaten für β - Sarcoglykan

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti- β Sarcoglykan (ab55683)	1:100	Monoklonal Maus	Abcam, Cambridge England

Tab. 5: Inkubationszeiten für β - Sarcoglykan

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB- Gemisch	40 Sek.	40 Sek.	45 Sek.	1 Min.	40 Sek.

(DIE, tief infiltrierende Endometriose)

Beta- Sarcoglykan ist eine Isoform und als ein Teil des Sarcoglykan-Komplexes zu sehen. Der Sarcoglykan-Komplex besteht aus einer α -, β -, γ -, δ - und ε -Sarcoglykan Untereinheit (Anastasi et al. 2005), die durch getrennte Gene kodiert wird (Constantin

2014). Sarcoglykane sind Einzel- Transmembranglykoproteine mit einem N-Terminus extrazellulär für α -Sarcoglykan und intrazellulär für β -, γ - und δ -Sarcoglykane (Constantin 2014). Das menschliche β -SG-Gen befindet sich auf 4q12 und ist 35 kb groß. Es besteht aus sechs Exons und besitzt einen Promotor (Ozawa et al. 2005). Der Sarcoglykan-Komplex ist Teil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, welcher aus einer Gruppe von integralen und Membran-assoziierten Proteinen besteht, die die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden (Hashimoto und Yamaguchi 2006). Beta- Sarcoglykan konnte in der glatten Muskulatur des Uterus nachgewiesen werden (Anastasi et al. 2007).

3.3.2 Antikörper Enpp2

Der zweite Antikörper Enpp2 (RayBiotech 119-16084) ist ein polyklonaler Anti-Kaninchen- Antikörper, der auch bei -20°C gelagert wird. Der Antikörper ist spezifisch für Mensch, Maus und Ratte. Die optimale Verdünnung wurde mit 1:100 bestimmt. Das HRP markierte- Polymer besteht aus einem Ziegen- Anti- Kaninchen- Antikörper-Konjugat (Dako, Hamburg). Enpp2 wurde ebenfalls auf dem Uterus und allen Entitäten getestet mit folgenden Einwirkzeiten (Tab. 7).

Tab. 6: Stammdaten für Enpp2

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-Enpp2 (Code: 119-16084)	1:100	polyklonal Kaninchen	RayBiotech, Norcross, USA

Tab. 7: Inkubationszeiten für Enpp2

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB- Gemisch	30 Sek.	30 Sek.	1 Min.	1 Min.	1 Min.

Enpp2 ist die Abkürzung für ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2.

Das Glykoprotein ist auch unter dem Namen „Autotaxin“ bekannt. Das Enzym gehört zu einer Familie, die Phosphodiester- Verbindungen von unterschiedlichen DNA-Bausteinen hydrolysieren (Stefan et al. 2005). Enpp2 konnte bislang in Uteri von Ratten und Schweinen nachgewiesen werden (Ahn et al. 2011, Seo et al. 2012).

3.3.3 Antikörper Pck2

Beim Primärantikörper Pck2 (Thermo Scientific PA5-30221) handelt es sich ebenfalls um einen polyklonalen Kaninchenantikörper, der auf Mensch, Maus und Ratte getestet werden kann. Die Lagertemperatur beträgt -20°C. Die Verdünnung mit dem Antibody Diluent wurde mit 1:100 gewählt. Die Inkubationszeiten lauten für die Gewebe (Tab. 9).

Tab. 8: Stammdaten für Pck2

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-Pck2 (PA5-30221)	1:100	polyklonal Kaninchen	Thermo Scientific, Rockford USA

Tab. 9: Inkubationszeiten für Pck2

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB- Gemisch	35 Sek.	35 Sek.	55 Sek.	55 Sek.	55 Sek.

Pck2 ist auch unter dem Namen PEPCK Phosphoenolpyruvate carboxykinase bekannt. Es existieren zwei Isoformen; eine zytosolische Form, die Pck1 oder PEPCK-C, und eine mitochondriale Variante, Pck2 oder PEPCK-M (Nordlie und Lardy 1963). Beide werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert (Hanson und Garber 1972). Das Enzym katalysiert die GTP- getriebene Umsetzung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat. In bisherigen Untersuchungen konnte das Protein Pck2 in den endometrialen Stromazellen des Uterus nachgewiesen werden (Bombail et al. 2010).

3.3.4 Antikörper Pace4

Der vierte getestete Primärantikörper Pace4 (Abcam ab110144) ist ein polyklonaler Ziegenantikörper, welcher bei den Spezies Mensch, Maus und Ratte angewendet werden kann. Die Lagerungstemperatur beträgt -20°C. Die durchgeführte Verdünnung wurde mit 1:100 gewählt. Es wurden die Gewebe Uterus, Ovar und DIE gefärbt. Die Einwirkzeiten für die unterschiedlichen Gewebearten betragen (Tab. 11).

Tab. 10: Stammdaten für Pace4

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-Pace4 (ab110144)	1:100	polyklonal Ziege	Abcam, Cambridge England

Tab. 11: Inkubationszeiten für Pace4

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB-	1Min.	n. getestet	1Min.	n. getestet	1Min.
Gemisch	20sek.		20sek.		20Sek.

Pace4 steht für **p**aired **b**asic **a**mino **a**cid **c**leaving **e**nzyme. Die Zahl 4 stellt nomenklatorisch den vierten entdeckten Typ in dieser Familie dar (Wise et al. 1990). Es handelt sich um eine Proprotein Konvertase, welche auf dem Chromosom 15 lokalisiert ist. Es ist im Gewebe weit verbreitet (Kiefer et al. 1991). Pace4 ist bei der proteolytischen Prozessierung von Pro-Proteinen, Propeptidhormonen und Proneuropeptiden beteiligt. Diese posttranslationale Prozessierung ist ein gemeinsamer Mechanismus in der Herstellung von biologisch aktiven Peptiden und Proteinen (Tsuji et al. 1999). Es wird sekretiert und geht eine Verbindung an der extrazellären Matrix mit Heparansulfat- Proteoglykanen ein (Tsuji et al. 2003). Eine besonders hohe Konzentration lässt sich in der Hypophyse und in den Purkinjezellen des Kleinhirns nachweisen (Mains et al. 1997). Es ist auch in den β - Zellen des Pankreas zu finden (Nagamune et al. 1995).

Die zellulären Lokalisationen im endokrinen Gewebe weisen darauf hin, dass es bei der

Regulierung von neuroendokrinen Prozessen mitwirkt (Mains et al. 1997).

3.3.5 Antikörper Gsk3 β

Bei diesem Primärantikörper handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchenantikörper, der auf Mensch, Maus, Ratte und Rind getestet werden kann. Der Antikörper sollte laut Hersteller bei -20°C gelagert werden. Es wurde eine 1:100 Verdünnung gewählt. Der Antikörper wurde auf dem Uterus, Ovar und DIE mit folgenden Inkubationszeiten erprobt (Tab. 13).

Tab. 12: Stammdaten für Gsk3 β

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-Gsk3β (07-1413)	1:100	polyklonal Kaninchen	Millipore, Billerica USA

Tab. 13: Inkubationszeiten für Gsk3 β

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB-	1Min.	n. getestet	1Min.	n. getestet	1Min.
Gemisch	20Sek.		20Sek.		20Sek.

Gsk3 β steht für Glykogensynthasekinase-3 Beta. Es ist eine Protein-Serin-Kinase und gilt als ein Regulator im Glykogen-Metabolismus. Die Proteinkinasen phosphorylieren die Glykogensynthase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykogensynthese (Stambolic und Woodgett 1994). Neueren Studien zufolge kann Gsk3 β beim Zellwachstum, bei der Motilität und Apoptose beteiligt sein (Gao et al. 2013). Ebenfalls spielt Gsk3 β im Gehirn eine Rolle. Hier ist es reichlich vorhanden, sodass es bei Signaltransduktionskaskaden der neuronalen Zellentwicklung und dem Energiestoffwechsel beteiligt ist (Chen et al. 2015). Es wird auch eine Verbindung mit der Pathogenese von Alzheimer vermutet, wo eine vermehrte Aktivität von Gsk3 β vorzufinden ist (Forlenza et al. 2011). Eine weitere neurodegenerative Erkrankung wie

Parkinson wird ebenso in Zusammenhang mit einer Dysregulation von Gsk3 β gebracht (Golpich et al. 2015).

3.3.6 Antikörper CD9

Bei dem folgenden Primärantikörper handelt es sich um einen polyklonalen Ziegenantikörper. Er bindet spezifisch auf Geweben von Mensch, Maus und Ratte und wird bei einer Temperatur von 4°C gelagert. Ein Einfrieren des Antiköpers sollte vermieden werden. Bei diesem Antikörper wurde kein Citratpuffer von pH=6 verwendet, sondern ein Puffer von pH=9 benutzt. Es wurde ebenfalls auf 1:100 verdünnt. Die Zeiten der Inkubation für die Gewebe sind (Tab. 15).

Tab. 14: Stammdaten für CD9

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-CD9 (Sc-7639)	1:100	polyklonal Ziege	Santa cruz Biotechnology, Dallas USA

Tab. 15: Inkubationszeiten für CD9

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB-	1Min.	n. getestet	1Min.	3Min.	1Min.
Gemisch			20Sek.		30Sek.

CD9 gehört zu der Tetraspanin Familie, welche membranorganisierende Proteine sind. Sie kennzeichnen sich durch das Vorhandensein von vier hoch konservierten Transmembran-Regionen mit verschiedenen physiologischen Funktionen (Castro et al. 2015). CD9 besteht aus 228 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24 kDa (Herr et al. 2014). Tetraspanine regulieren die Zellmorphologie, Motilität, Invasion, Fusion und Signalübermittlung im Gehirn, Immunsystem und in Tumoren (Hemler

2005). CD9 ist speziell an verschiedenen biologischen Funktionen mit beteiligt, einschließlich Zelladhäsion, Metastasen, Wachstum, Signaltransduktion, Differenzierung und Sperma-Ei-Fusion (Yoon et al. 2013). Eine Herunterregulierung von CD9 steht im Zusammenhang mit der Tumorprogression und Metastasierung bei Blasen-, Brust-, Lungen- und Darmkrebs (Zöller 2009).

3.3.7 Antikörper WDR13

Bei dem letzten getesteten Primärantikörper geht es um einen polyklonalen Kaninchenantikörper, welcher ausschließlich für humane Gewebe bestimmt ist. Die Lagerungstemperatur beträgt -20°C. Die Verdünnung lag bei 1:100. Die Färbezeit für die Gewebearten beträgt (Tab. 17).

Tab. 16: Stammdaten für WDR13

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft Spezies	Hersteller
Anti-WDR13 (HPA000913)	1:100	polyklonal Kaninchen	Sigma- Aldrich, St. Louis USA

Tab. 17: Inkubationszeiten für WDR13

Entität	Uterus	Adenomyose	Ovar	Peritoneum	DIE
Einwirkzeit					
DAB-	1Min.	n. getestet	1Min.	1Min.	1Min.
Gemisch	10Sek.		50Sek.	30Sek.	30Sek.

WDR13 gehört zu der großen WD- *repeat* Proteinfamilie; diese Proteine finden sich nahezu in allen Eukaryonten wieder. Die Abkürzung WD steht für Tryptophan und Aspartat. Sie werden mit einer Vielzahl von wichtigen Funktionen in Verbindung gebracht (Smith et al. 1999). WDR13 besteht aus 9 Exons und 8 Introns. Das Gen befindet sich auf dem Locus Xp11.23 (Singh et al. 2003). Studien zeigten, dass die WD-

Proteine als ein Gerüst mit verschiedenen Proteinen, Peptiden oder Nukleinsäuren auf mehreren Oberflächen interagieren (Stirnemann et al. 2010). Die subzelluläre Lokalisierung des WDR13 Proteins im Kern deutet darauf, dass es eine regulatorische Rolle in der Kernfunktion zusammen mit einer Protein-Protein-Wechselwirkung hat, ebenso wie andere Subtypen der WD-Familie (Singh et al. 2003). Insgesamt ist durch die funktionelle Heterogenität der WD- Familie ihre biologische Bedeutung schwer gegeneinander abgrenzbar (Suresh et al. 2005).

3.4 Digitale Auswertung

Die Objektträger wurden unter einem Lichtmikroskop in verschiedenen Vergrößerungen ausgewertet. Es wurde nach folgenden Kriterien analysiert: Sind die Drüsenstrukturen positiv oder negativ?; ist die Färbung im Zytoplasma oder im Kern der Zelle lokalisiert und welche Gewebearten sind gefärbt worden? Ebenfalls wurden die gefärbten Drüsenstrukturen ausgezählt und die Intensität bzw. der Färbegrad pro Drüse prozentual geschätzt. Anschließend wurden die Präparate von einer Olympus FSX 100 Digitalmikroskop- Kamera am Computer mit der Software Olympus FSX-BSW dokumentiert und betreffende Stellen in unterschiedlichen Auflösungen digital gespeichert. Zum Schluss wurden die Aufnahmen mit Adobe Photoshop bearbeitet und alle Informationen in PowerPoint und Excel eingefügt.

3.5 Statistische Auswertung

Für die generierten Daten aus der immunhistochemischen Analyse wurde das Statistikprogramm von GraphPad Prism 6.01 für Windows benutzt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit, bei der $p \leq 0,05$ war, konnte von einer statistischen Signifikanz gesprochen werden. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert in % mit dem Standardfehler des Mittelwertes (Mean \pm SEM) angegeben. Für das Alter der Patientinnen wurde der Median gewählt. Für die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Gruppen wurde der nicht- parametrische Mann- Whitney- Test verwendet. Bei der Varianzanalyse von mehr als drei Gruppen wurde auf den nicht parametrischen Kruskal- Wallis- Test zurückgegriffen.

3.6 Chemikalien

Tab. 18: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Antibody Diluent (TRIS HCL)	Dako, Hamburg DE
BSA (Bovines Serum Albumin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE
DAB + Substratpuffer / DAB+ Chrom.	Dako, Hamburg DE
Citronensäure	Merck, Darmstadt DE
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt DE
Ethanol 100%	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
FLUKA Eukitt	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt DE
GIBCO® -PBS- Tabletten	Thermo Scientific, Waltham USA
Haemalaun nach Meyer	Waldeck Münster, DE
Methanol 100%	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt DE
Neoclear	Merck, Darmstadt DE
Labelled Polymer-HRP-Anti- Spezies	Dako, Hamburg DE
Pikrinsäure	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Triton X 100	Sigma- Aldrich, St. Louis USA
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE
Puffer pH=9	Dako, Hamburg DE

3.7 Zusammensetzung der Lösungen

Blockpuffer:

1g BSA + 70 ml PBS Gebrauchslösung + 21 µl Triton-X 100

Bouin:

Stammlösung 500ml Pikrinsäure flüssig+ 167ml Formaldehyd 37% (Dunkel lagern)

Gebrauchslösung 30ml Stammlösung + 1,5ml 100% Essigsäure (Dunkel lagern)

Citratpuffer:

Lösung A: 0,1 Mol Zitronensäure 21,01g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest lösen

Lösung B: 0,1 Mol Natriumcitrat 29,41g Natriumcitrat in 1000 ml Aqua dest lösen

Gebrauchslösung:

25ml Lösung B + 270 ml Aqua dest mischen und mit Lösung A auf pH 6,0 einstellen

PBS- Gebrauchslösung:

4 Tabletten Gibco PBS mit 1l destillierten Wasser mischen

0,3 % Wasserstoffperoxid in eiskaltem Methanol:

45 ml eiskaltes Methanol + 5ml 30 % Wasserstoffperoxid

3.8 Verbrauchsmaterialien

Tab. 19: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Atemschutzmaske	Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE
Dako PAP- Pen	Dako, Hamburg DE
Deckgläschen Masse 24x 26mm, 22x 22mm, 24x 36mm, 24x 60mm	R. Langenbrink, Emmendingen DE
Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg DE
Falcon Röhrchen 50ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster AUT
Handschuhe	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter DE
Kimtech Science Tücher	Kimberly-Clark, Roswell USA
Mikrotom-Skalpelle	Feather, Osaka JPN
Objektträger	R. Langenbrink, Emmendingen DE
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,5ml, 5ml	Eppendorf, Hamburg DE
Vasco-Nitrilhandschuhe	Braun, Melsungen DE

3.9 Laborgeräte

Tab. 20: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Einbettautomat TP1050	Leica, Wetzlar DE
Eiswürfelmaschine WESSAMAT	Wessamat, Kaiserslautern DE
Eppendorfpipetten 20µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg DE
Feuchtekammer	Dako, Hamburg DE
Heizplatte mit Magnetrührer IKAMAG	IKA, Staufen DE
Heraeus Inkubator	Thermo Scientific, Waltham USA
Kühlschrank 20°C	Bosch, Gerlingen DE
Kühlschrank 4°C	VWR International, Radnor USA
Mikrotom HM 400	Leica, Wetzlar DE
Mikroskop Lux S	Leica, Wetzlar DE
Mikroskop Dialux 20	Leica, Wetzlar DE
Multigourmet	Braun, Melsungen DE
Olympus FSX 100	Olympus, Tokio JPN
pH Meter CG 841	Schott, Hofheim DE
Schüttler IKA- VIBRAX- VXR	IKA, Staufen DE
Waage 1219MP	Sartorius AG, Göttingen DE
Wasserbad GFL 1052	GFL, Burgwedel DE
Vortex	Bender& Hobein AG, Bruchsal DE
Zentrifuge Sprount	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf DE

4. Ergebnisse

Die Endometriose ist in ihrer Pathophysiologie nicht ausreichend erforscht.

Die vorliegende Untersuchung zielte darauf ab, eine Analyse von Biomarkern im Endometrium mit und ohne Endometriose vorzunehmen, sowie in den endometriotischen Entitäten. Es wurde speziell nach Proteinen gesucht, welche in möglichst vielen Drüsenzellen des Epithels eine Expression aufweisen.

Die Experimente an den Geweben wurden mit immunhistochemischen Nachweisen durchgeführt. Einzelne Biomarker wurden nach ihrem Färbegrad in den Entitäten kategorisiert. Als Kriterium war es wichtig, nach der höchstmöglichen Anzahl an gefärbten Epithelzellen, wenigen stromalen Zellfärbungen und einem guten Signal zu Rausch-Verhältnis zu suchen. Es wurden zuerst mit sieben ausgewählten Antikörpern (Pace4, Gsk3 β , CD9, WDR13, β -SG, Enpp2 und Pck2) Vorversuche gemacht. Die Gewebeproben wurden aus Uterus, Ovar, Peritoneum und DIE gewonnen. Insgesamt wurden 33 Patientinnen mit Uteri, davon 10 mit Adenomyosen, 19 Patientinnen mit Ovarien, 19 peritoneale Endometriosepatientinnen mit 30 Läsionen und 19 Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose à 20 Läsionen miteinbezogen. Eine Läsion steht hier für einen Gewebeschnitt, so bedeutet z.B. 30 Läsionen 30 Gewebeproben von 19 Patientinnen vom Peritoneum (Tab. 21), denn ein und dieselbe Probandin kann an unterschiedlichen Stellen im Peritoneum endometriotische Läsionen haben. Dies gilt genauso für die tief infiltrierende Endometriose. Es wurde nur Gewebematerial für die Analysen berücksichtigt, welches methodisch und statistisch reproduzierbar war. Bei den verwendeten Geweben wurden die negativen Gewebeschnitte, die nicht verwertbar waren, herausgerechnet. Hierzu zählten Patientinnen mit Uteri in der Menopause, Patientinnen mit keinen nachweisbaren Drüsen auf den Gewebeschnitten, Patientinnen deren Präparate nicht verwertbar waren aufgrund schlecht erhaltener Läsionen sowie Probandinnen deren Gewebeschnitte die gleiche Lokalisation aufwiesen, wie z.B. Endometrioseherde am Ligamentum sakrouterinum links und rechts (Tab. 21 und 22).

Tab. 21: Immunhistochemischer Nachweis an Patientinnen mit Endometriose und Anzahl an Läsionen für die Marker β -SG, Enpp2 und Pck2.

Entitäten	Patientinnen (n)	Läsionen (n)	Alter Median (Range)
Uterus (ohne Endometriose)	23		43 (28- 54)
Adenomyose	10		45,5 (26- 54)
Ovar	19		34 (28- 63)
Peritoneum (PE)	19	30	35 (19- 50)
DIE	19	20	34 (26- 46)

Tab. 22: Immunhistochemischer Nachweis an negativ getesteten Probandinnen für die Marker β -SG, Enpp2 und Pck2.

Entitäten	keine Drüsen	nicht verwertbar	gleiche Lokalisation	Menopause
Uterus	4			2
Adenomyose			1	1
Ovar		1		
Peritoneum	1	9	1	
DIE	4	2	2	
Σ	9	12	4	3

(PE, Peritoneum)

4.1 Zusammenschau der verwendeten Proben für β -SG, Enpp2 und Pck2

In der folgenden Tabelle 23 sind die verwendeten Gewebeproben für die drei Proteine (β -SG, Enpp2 und Pck2) in den verschiedenen Entitäten dargestellt.

Tab. 23: Charakteristik der Gewebeproben für β -SG, Enpp2 und Pck2.

	Endometrium	Ovarielle Endometriose	Peritoneale Endometriose	DIE
Alle Proben	n=33	n=19	n=19(30)	n=19(20)
Alter Median (Range)	45 (26- 54)	34 (28- 63)	35 (19- 50)	34 (26- 46)
Sekretionsphase	n=19			
Alter Median (Range)	44 (26- 54)			
Proliferationsphase	n=14			
Alter Median (Range)	45,5 (28- 54)			
Leiomyome	n=11			
Uterusmyome	n=1			
Adenomyose	n=10			
Blase			n=10	n=1
Ligamentum sakrouterinum			n=4	n=3
Fossa ovarica			n=4	n=1
Douglasraum			n=2	
Ligamentum teres			n=1	
Peritoneum			n=3	
Ligamentum infundibulo pelvicum			n=2	
Beckenwand			n=3	
Mesogastrium			n=1	
Rektum				n=4
Septum rektovaginale				n=4
Paraurethral				n=1
Rektosigmoid				n=1
Kolon				n=1
Dünndarm				n=1
Weichteilgewebe Leiste				n=2
Ureter				n=1

n= 19 (30) steht für 30 Läsionen von 19 Patientinnen

4.2 Screening von Proteinen für epitheliale Zellen im Uterus, Ovar, PE und DIE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Biomarker im Endometrium, in der Adenomyose, in der ovariellen, peritonealen und der tief infiltrierenden Endometriose dargestellt. Es handelt sich um sieben Marker: Pace4, eine Proprotein- Konvertase, Gsk3 β , eine Protein-Serin- Kinase, CD9, ein membranorganisierendes Protein, WDR13, ein ubiquitär lokalisiertes Kernprotein, β -SG, ein Transmembranglykoprotein, Enpp2, ein sekretiertes Glykoprotein und Pck2, ein GTP- katalysierendes Enzym. Die Marker CD9 (Park et al. 2000), Pace4 (Freyer et al. 2007) Gsk3 β , WDR13, β -SG, Enpp2 und Pck2 (Wilhelm et al. 2014) wurden aufgrund der o.g. Literaturrecherchen für die nachfolgenden immunhistochemischen Experimente ausgewählt, da diese eine Präferenz im Epithel des Endometriums vermuten ließen.

Diese sieben biologischen Marker wurden zuerst am Uterus immunhistochemisch getestet. Weitere typische Färbecharakteristika und Expressionsmuster des endometrialen und endometriotischen Epithels werden nachfolgend beschrieben. Es werden verschiedene digitale Aufnahmen in unterschiedlichen Vergrößerungen dargestellt.

4.2.1 Lokalisation von Pace4 im Uterus und in der Endometriose

Pace4 ist eine Proprotein- Konvertase, welche an der Prozessierung von Pro-Proteinen, Propeptidhormonen und Proneuropeptiden beteiligt ist (Tsuji et al. 1999). In der nachfolgenden Abb. 8a sieht man eine Übersichtsaufnahme von einem Uterusabschnitt mit den Endometriumschichten Funktionalis und Basalis, sowie dem Myometrium. Das Endometrium und Myometrium des Uterus ist gänzlich gefärbt. Die Drüsen im Endometrium sind stärker als die Myometriumzellen gefärbt. In der Vergrößerungsaufnahme Abb. 8b sind die endometrialen Drüsen im Epithel homogen angefärbt. Alle auf dem Gewebeabschnitt vorzufindenden Drüsen sind zu 100% gefärbt. Das Epithel ist hochprismatisch aufgebaut. Es findet sich eine rein zytoplasmatische Färbung in allen Epithelzellen. Das Stroma im Endometrium ist durchgehend gefärbt, aber deutlich schwächer als das Epithel.

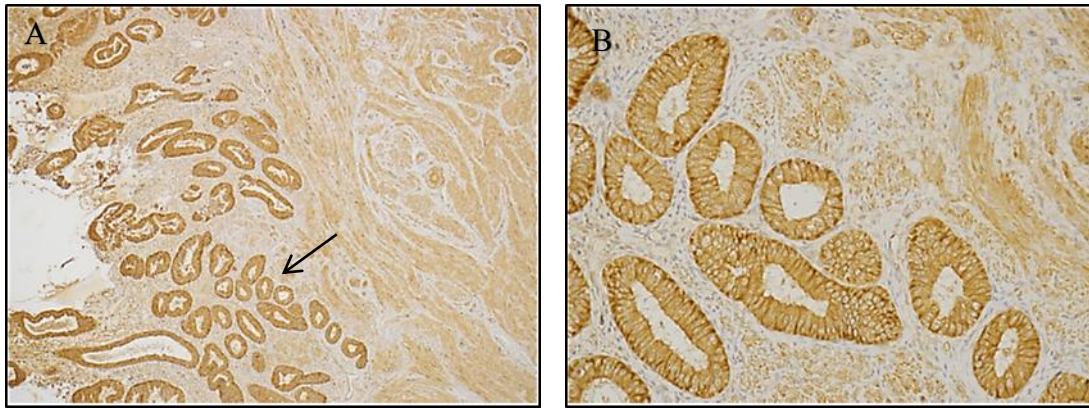


Abb. 8a/b: Histologisches Schnittpräparat eines Uterus in der Proliferationsphase mit Leiomyomen im Corpus uteri. Die Patientin hat eine Endometriose im Bereich des Ligamentum sakrouterinum beidseits. Nachweis von Pace4 im Endometrium und Myometrium. Abb. 8b stellt die Ausschnittsvergrößerung von Abb. 8a dar (s. Pfeil).
Abb. 8a Vergrößerung X4.2 Abb. 8b Vergrößerung X17

In der Abb. 9a sieht man einen Teilausschnitt einer Endometriosezyste im Ovar. Es ist deutlich zu sehen, dass die iso- bis hochprismatischen Epithelzellen nur sehr geringfügig zytoplasmatisch gefärbt sind. Der Marker Pace4 ist im ovariellen Stroma dagegen durchgehend nachzuweisen.

Abb. 9b zeigt eine Endometriosezyste, die ebenfalls nur sehr schwach zytoplasmatisch gefärbt ist. Das Stroma des Ovars ist weitgehend negativ bis auf das direkt dem Epithel angrenzende Stroma (s. Pfeil).

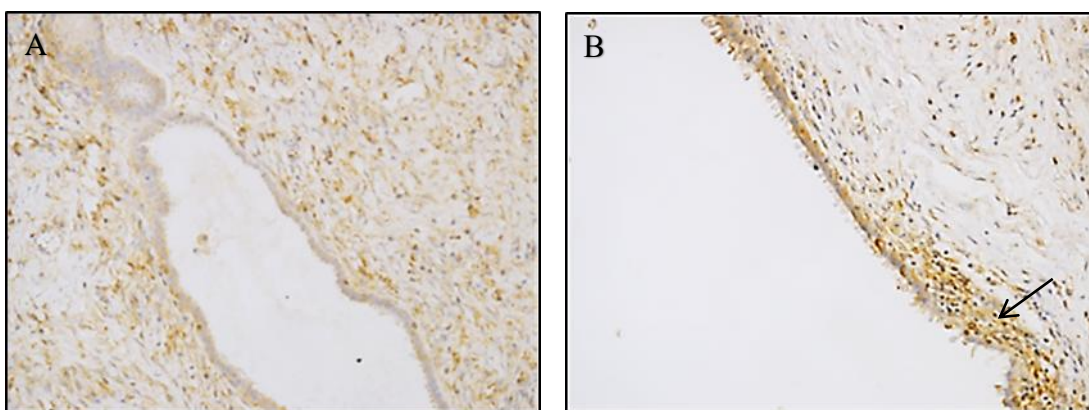


Abb. 9a/b: Immunhistochemische Gewebeprobe von einem Ovar mit ausgebrannter Endometriosezyste mit einem breiten hyalinisierten bindegewebigen Randsaum (Abb. 9b, Pfeil). Nachweis von Pace4 im Stroma des ovariellen Gewebes.
Abb. 9a Vergrößerung X17 Abb. 9b Vergrößerung X17

Das nachfolgende Präparat ist in einer Übersichtsaufnahme mit einer extragroßen endometriotischen Läsion dargestellt (Abb. 10a). Der rektovaginale Befund ist eine tief infiltrierende Endometriose. In der Vergrößerungsaufnahme in Abb. 10b sieht man deutlich eine ganzheitliche Färbung der zytoplasmatischen Anteile der Läsion, welche durch den Marker Pace 4 zustande kommt. Das hochprismatische Epithel ist sowohl basal als auch luminal homogen positiv. Die Kerne sind negativ ebenso wie das Stroma. Insgesamt weisen beide Gewebearten DIE und Uterus bei Pace4 in der zytoplasmatischen Färbung des Epithels gleiche Muster auf. Pace4 färbt im Uterus und Ovar das Stroma stärker als in der DIE. Pace4 wurde für die weiteren Untersuchungen nicht genommen aufgrund einer zu schwachen Färbung des Epithels im Ovar und einer zu intensiven Färbung des Stromas im Endometrium und dem Myometrium des uterinen Gewebes. Die Entität Peritoneum wurde aus diesen Gründen nicht immunhistochemisch analysiert.

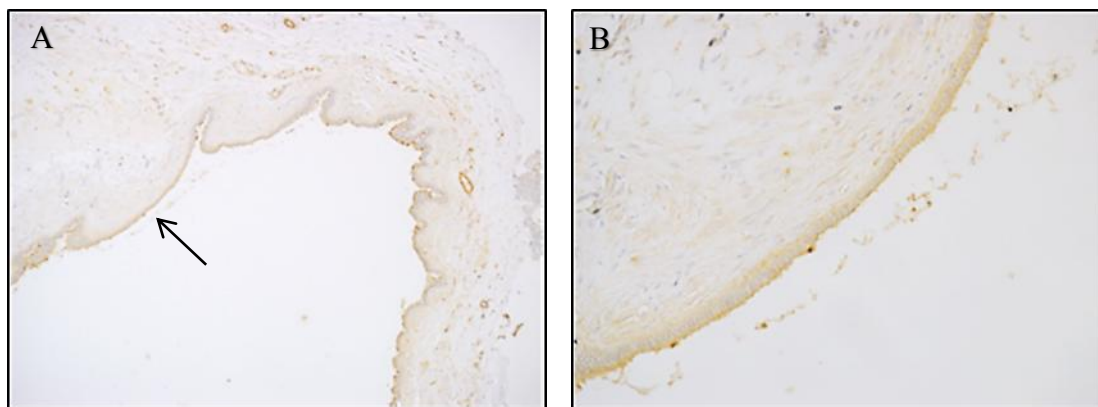


Abb. 10a/b: Immunhistochemische Gewebeprobe mit Pace4 aus dem rektovaginalen Bereich mit ausgedehnten Endometrioseherden im rektovaginalen Stroma. Alte Stromahämorrhagien sind noch vorhanden. Ebenfalls sind Endometrioseherde im Ovar vorzufinden. Der Pfeil in Abb. 10a zeigt eine Vergrößerungsaufnahme in Abb. 10b. Abb. 10a Vergrößerung X4.2 Abb. 10b Vergrößerung X17

4.2.2 Lokalisation von Gsk3 β im Uterus und in der Endometriose

Gsk3 β ist eine Protein-Serin Kinase, die eine regulatorische Rolle im Glykogen-Metabolismus spielt (Stambolic und Woodgett 1994). In der folgenden Abb. 11a sieht man eine Übersichtsaufnahme von einem Uterusabschnitt mit den

Endometriumschichten Funktionalis und Basalis, sowie dem Myometrium. Es handelt sich um dieselbe Patientin wie in Abb. 8a/b. Der Uterus ist mit dem getesteten Protein Gsk3 β im Endometrium und Myometrium homogen gefärbt. In der Vergrößerung sind die endometrialen Drüsen im Epithel intensiv angefärbt. Das Epithel ist zylinderförmig aufgebaut. In der Vergrößerungsaufnahme Abb. 11b kann eine rein zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. Die Lamina propria ist ebenfalls stark positiv. Insgesamt sind das Färbemuster und die Intensität in diesem Uterus sehr ähnlich, wenn nicht sogar identisch zum Biomarker Pace4 (Abb. 8a/b). Beide Proteine, Pace4 und Gsk3 β , zeigten eine ausgeprägte durchgängige Lokalisation in allen Drüsen, Stroma und Muskelzellen des Uterus.

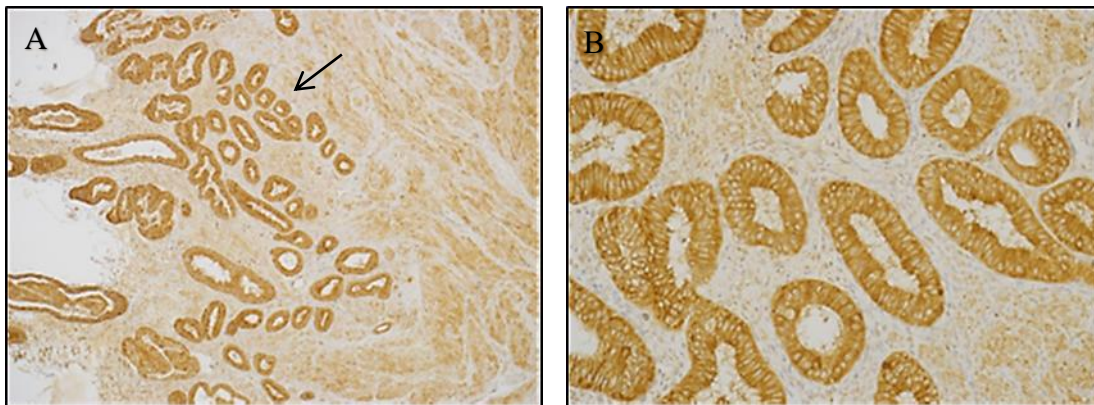


Abb. 11a/b: Immunhistochemisches Präparat eines Uterus in der Proliferationsphase mit Leiomyomen im Corpus uteri (vgl. Abb. 8a/b). Die Patientin hat eine Endometriose im Bereich des Ligamentum sakrouterinum. Es handelt sich um einen immunhistochemischen Nachweis von Gsk3 β im Uterus. Der Pfeil in Abb. 11a markiert die Detailaufnahme in Abb. 11b.

Abb. 11a Vergrößerung X4.2 Abb. 11b Vergrößerung X17

Das Ovar mit seinen Endometriosezysten ist sowohl in Abbildung 12a als auch in Abb. 12b komplett negativ. Das Stroma ist in Abb. 12a ebenfalls nicht immunhistochemisch positiv. In Abb. 12b ist das Stroma dagegen heterogen mit dem Protein Gsk3 β gefärbt

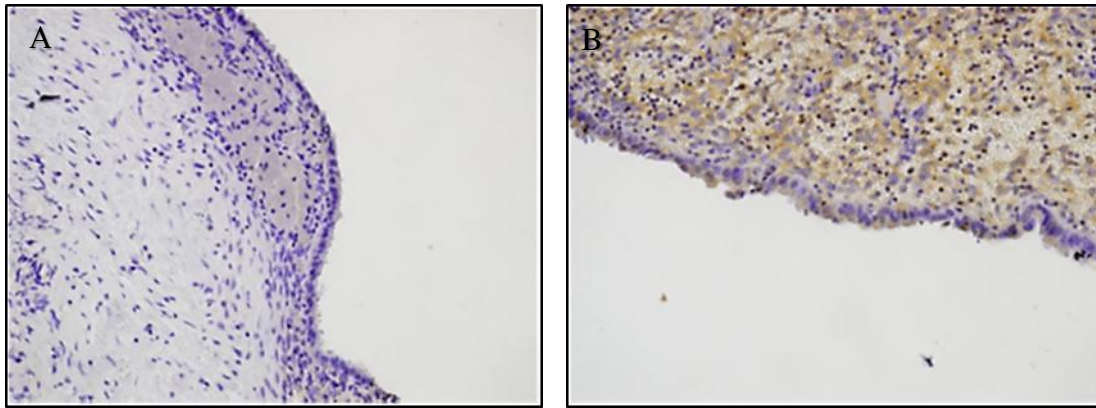


Abb. 12a/b: Immunhistochemischer Nachweis von einem Ovar mit ausgebrannter Endometriosezyste mit einem breiten hyalinisierten bindegewebigen Randsaum. Nachweisreihe von Gsk3 β im ovariellen Gewebe.

Abb. 12a Vergrößerung X17 Abb. 12b X17

Die Endometrioseschleimhautinseln aus dem Resektat des rektovaginalen Gewebes zeigen eine überwiegend durchgängige Lokalisation von Gsk3 β in den Epithelzellen der Drüsen (Abb. 13). In der Übersichtsaufnahme ist die rechts lokalisierte Läsion nur teilweise erhalten, was sich auf die Färbequalität auswirkt (Abb. 13a Pfeil). In der Ausschnittsvergrößerung Abb. 13b sieht man wie homogen zytoplasmatisch die Drüse gefärbt ist. Eine leicht intensivere Betonung ist zum Lumen der Läsion zu erkennen. Das Epithel ist überwiegend hochprismatisch bis auf einen Abschnitt, der aufgrund der Schnittebene mehrschichtig erscheint. Das zytogene Stroma, sowie die Umgebung zeigen keine Färbung.

Gsk3 β wurde nicht weiter verwendet, weil das Stroma im Endometrium und die Muskelzellen des Uterus zu stark gefärbt wurden. Außerdem konnte im Ovar Gsk3 β die Epithelzellen nicht färben. Das Peritoneum wurde wie bei Pace4 aus den o.g. Gründen nicht getestet.

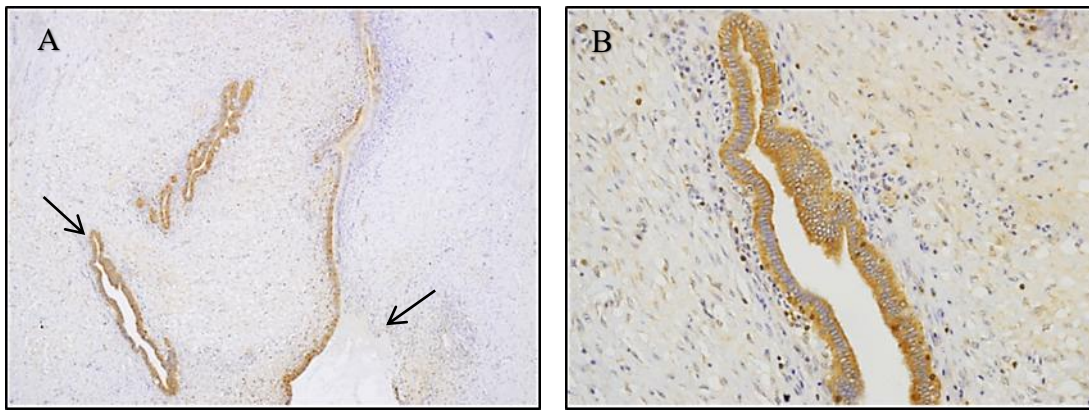


Abb. 13a/b: Immunhistochemischer Nachweis von Gsk3 β in einem rektovaginalen Resektat mit einem Einschluss von Endometriumschleimhautinseln (DIE), knotig fibrosiertem Stroma und Myofibroblastenproliferaten. Abb. 13b ist eine Vergrößerung von Abb. 13a (linker Pfeil). Der rechte Pfeil in Abb. 13a stellt eine teilweise erhaltene endometriotische Läsion dar. Abb. 13a Vergrößerung X4.2 Abb. 13b Vergrößerung X17

4.2.3 Lokalisation von CD9 im Uterus und in der Endometriose

CD9, welches zu immunhistochemischen Versuchen verwendet wurde, ist ein Protein mit membranorganisierenden Funktionen (Castro et al. 2015). In der Übersichtsaufnahme von Abb. 14a sieht man einen Uterus mit Endometrium und Myometrium. Das Endometrium mit seinen Drüsen zeigt in der Detailaufnahme Abb. 14b nur eine gering ausgeprägte Färbung von CD9. Das Zytoplasma ist basal stärker als luminal betont. Die Kerne sind negativ, ebenso das Stroma des Endometriums, das Myometriums und das Oberflächenepithel.

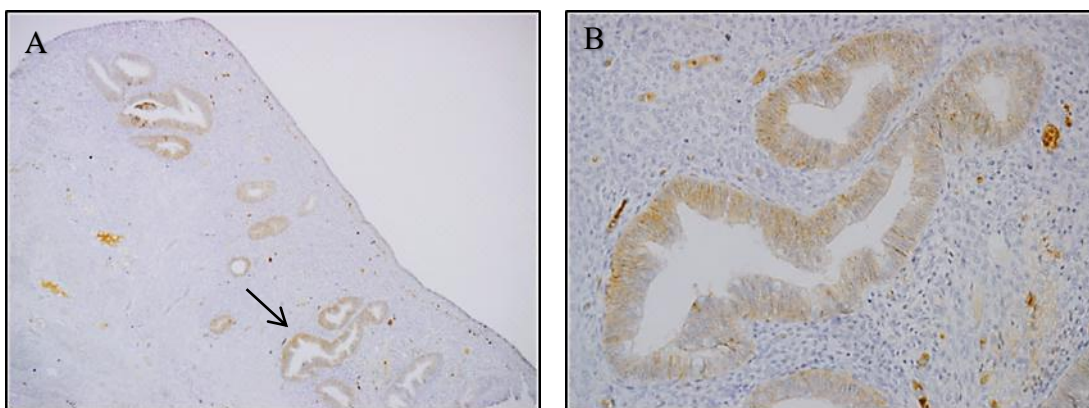


Abb. 14a/b: Immunhistochemischer Schnitt mit dem Nachweis von CD9 in einem

Uterus ohne histopathologische Veränderungen mit vollständig erhaltenem Oberflächenepithel. Der Pfeil in Abb. 14a stellt eine Ausschnittsvergrößerung von Abb. 14b dar. Abb. 14a Vergrößerung X4.2 Abb. 14b Vergrößerung X17

Der Marker CD9 zeigt in der DIE (Abb. 15a) und im Peritoneum (Abb. 15b) eine ähnliche Färbung. Die Läsionen sowohl in der tief infiltrierenden als auch in der peritonealen Endometriose zeigen keine Epithelfärbung. Das zytogene Stroma ist ebenfalls in beiden Entitäten nicht gefärbt. Die Umgebung zeigt eine leichte Hintergrundfärbung in Abb. 15a, welche als Artefakt zu werten ist. Insgesamt konnte CD9 in den endometriotischen Drüsenzellen des Peritoneums und der DIE nicht detektiert werden. Im Uterus färbte CD9 das Epithel der Drüsen zu schwach. Der Antikörper CD9 wurde deshalb auch nicht mehr weiter verwendet.

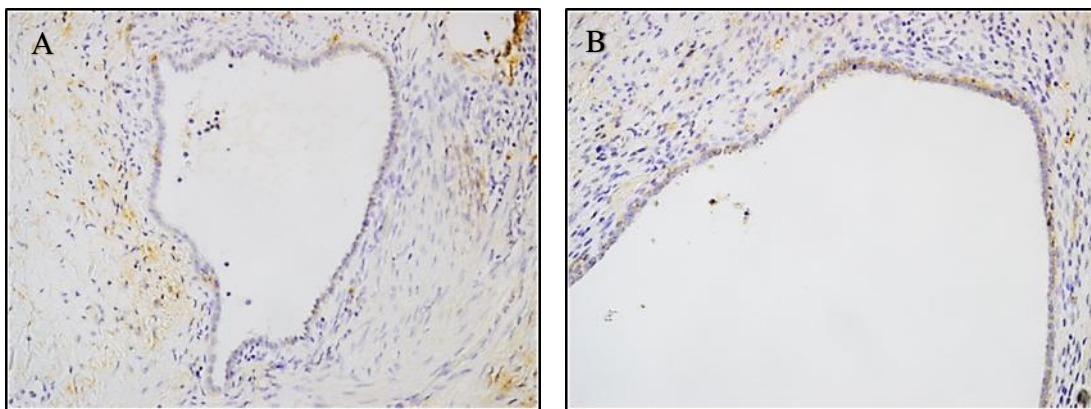


Abb. 15a: Immunhistochemischer Nachweis auf einem Gewebeschnitt mit CD9 von DIE- Endometrioseinseln, welche paraurethral lokalisiert sind. Endometriotische Läsionen sind bei dieser Patientin auch in der Beckenwand, Ligamentum sakrouterinum und am Blasendach vorzufinden. **Abb. 15b:** Immunhistochemische Versuchsreihe mit CD9 in Endometrioseinseln aus dem Blasendach (PE). Die Patientin hatte ebenfalls Endometriose paraurethral und am Ligamentum sakrouterinum. Es handelt sich somit um eine Patientin mit Endometriose in PE und DIE. Abb. 15a/b Vergrößerung X17

4.2.4 Lokalisation von WDR13 im Uterus und in der Endometriose

Das zu untersuchende Protein WDR13 gehört zu der WD- *repeat* Familie, das nahezu in allen Eukaryonten vorzufinden ist (Smith et al. 1999). Dem Protein wird eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Die Übersicht der Abb. 16a stellt einen Uterus im Serienschnitt, wie bei den Markern Pace4 (Abb. 8) und Gsk3 β (Abb. 11) verwendet, dar. Die Drüsen befinden sich in der Proliferationsphase. In Abb. 17a zeigen die Drüsen eine homogene Lokalisation von WDR13 in allen Epithelzellen. Im Gegensatz zu den Biomarkern Pace4, Gsk3 β und CD9 sieht man eine leichte Färbung in den Kernen der Drüsenzellen aufgrund der ebenfalls ausgemachten Kernlokalisation. Das Zytoplasma ist ebenfalls moderat gefärbt. Das Stroma des Endometriums und die Zellen des Myometriums sind weitgehend frei von Färbung.

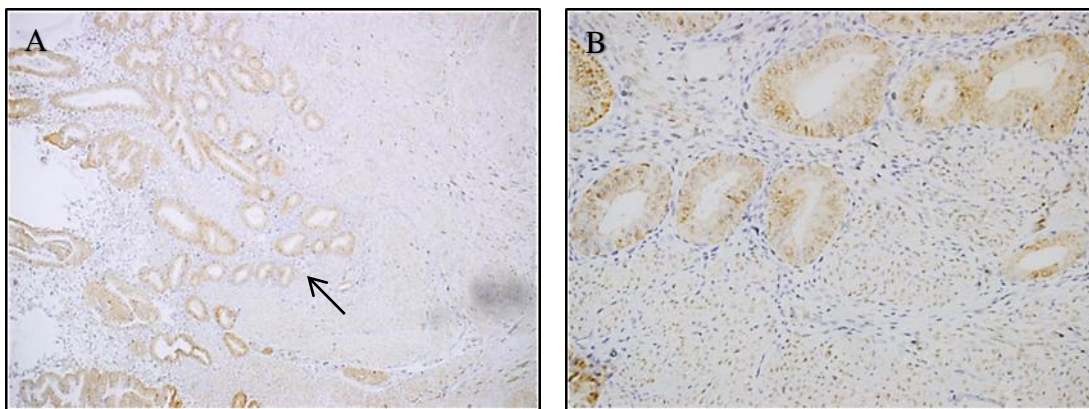


Abb. 16a/b: Immunhistochemischer Nachweis von WDR13 im Uterus in der Proliferationsphase mit Leiomyomen im Corpus uteri. Die Patientin hat eine Endometriose im Bereich des Ligamentum sakrouterinum beidseits (vgl. Abb. 8 und 11). Abb. 16b ist die Vergrößerung von Abb. 16a (s. Pfeil). Abb. 16a Vergrößerung X4.2
Abb. 16b Vergrößerung X17

Das Protein WDR 13 ist im Ovar mit seinen Zysten in beiden Abb. 17a und 17b nicht nachweisbar. Es ist weder eine epitheliale Betonung noch eine stromale Färbung zu erkennen. Eine minimale Hintergrundfärbung ist aufgrund der vermutlich leichten Schädigung des Gewebeschnitts in diesem Abschnitt zu erkennen (Abb. 17b, Pfeil). Somit konnte das Protein WDR13 im ovariellen Gewebe nicht detektiert werden.

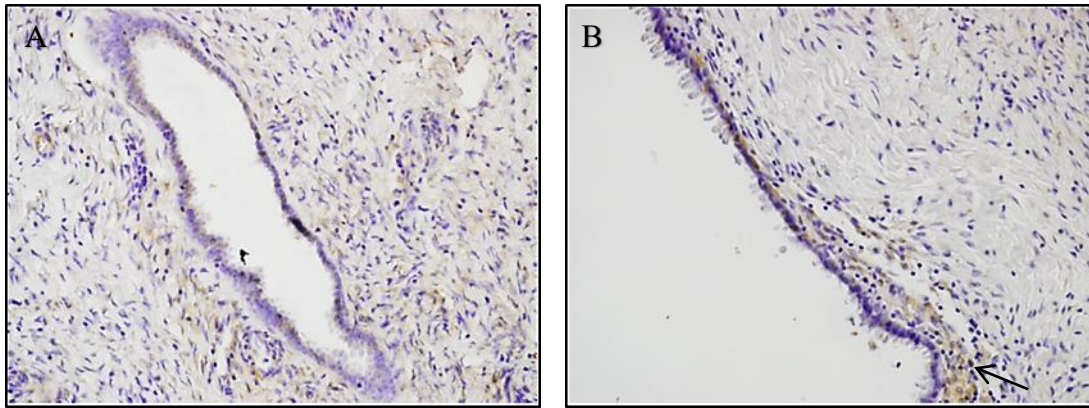


Abb. 17a/b: Immunhistochemischer Nachweis mit dem Protein WDR13 an einem Ovar mit ausgebrannter Endometriosezyste mit einem breiten hyalinisierten bindegewebigen Randsaum. Der Pfeil in Abb. 17b zeigt auf die Hintergrundfärbung von dem angrenzenden Stroma. Das Protein WDR13 ist im Ovar nicht detektierbar.

Abb. 17a/b Vergrößerung X17

Tiefe endometriotische Läsionen im Bereich des Ligamentum sakrouteri sind in Abb. 18a zu erkennen. Der Marker WDR13 ist weder in den Drüsen zu finden noch im Zytoplasma oder im Kern. Das angrenzende verdichtete Stroma und die Umgebung sind ebenso nicht gefärbt. Anders sieht es bei der peritonealen Blasendachläsion in Abb. 18b aus. Das Zytoplasma ist in seiner ganzen Zirkumferenz positiv. Die Kerne sind nicht positiv. Das im Lumen befindliche Zellgewebe ist eine Ansammlung von Blutungsresiduen. Zusammenfassend zeigt der Antikörper WDR13 in den vier getesteten Entitäten Uterus, Ovar, Peritoneum und DIE ein inhomogenes Färbeverhalten. Ein gutes Färbeverhalten zeigt WDR13 im Endometrium und in den peritonealen endometriotischen Drüsen. Dagegen ist WDR13 in den Endometriosezysten des Ovars und in den Drüsenformationen der tief infiltrierenden Endometriose nicht nachweisbar. Weitere Versuchsreihen für den Biomarker WDR13 wurden nicht mehr durchgeführt.

Es konnte keiner der vier getesteten Marker Pace4, Gsk3 β , CD9 und WDR13 in allen Entitäten Uterus, Ovar, Peritoneum und DIE den Auswahlkriterien: maximal gefärbte Epithelzellen, minimale Stromafärbung und ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis genügen. Pace4 und Gsk3 β zeigten ein ähnliches Färbeverhalten in den epithelialen Zellen. Beide waren im Endometrium sowie in der tief infiltrierenden Endometriose positiv. Im Ovar dagegen waren beide Proteine im Epithel nicht nachweisbar. CD9 zeigte im Endometrium eine schwache Färbung. Im Peritoneum und in der tief

infiltrierenden Endometriose war CD9 im Epithel negativ. WDR13 ist im Endometrium und Peritoneum positiv gewesen. Im Epithel des Ovars und der DIE war WDR13 hingegen negativ.

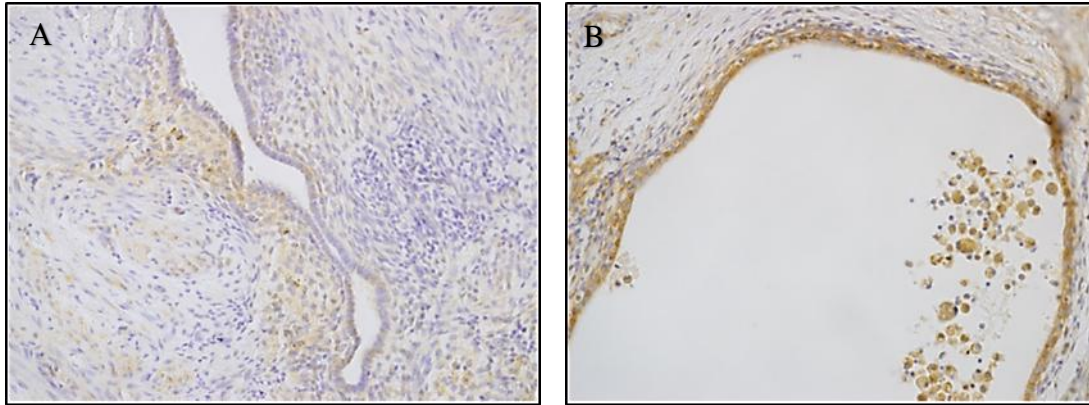


Abb. 18a: Immunhistochemischer Nachweis auf einem Gewebeschnitt mit WDR13 von DIE- Endometrioseinseln, die paraurethral lokalisiert sind. Endometriotische Läsionen waren bei dieser Patientin auch in Beckenwand, Ligamentum sakrouterinum und Blasendach vorzufinden. **Abb. 18b:** Immunhistochemischer Nachweis auf einem Gewebeschnitt mit WDR13 in Endometrioseinseln aus dem Blasendach (PE). Die Patientin hatte ebenfalls Endometriose paraurethral und am Ligamentum sakrouterinum. Es handelt sich somit um eine Patientin mit Endometriose in PE und DIE.

Abb. 18a/b Vergrößerung X17

4.3 Etablierung der drei Marker β -SG, Enpp2 und Pck2

In der vorliegenden Untersuchung verwendeten wir mehrere Antikörper (s.o.) zum Nachweis von Epithelzellen in endometrialen sowie endometriotischen Drüsen. Beta-Sarcoglykan, Enpp2 und Pck2 wiesen eine hohe Präferenz in den eutopen endometrialen Drüsen des Uterus auf, sodass diese Proteine mit einer sehr hohen Empfindlichkeit und mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis für die weiteren Analysen verwendet wurden. Basierend auf diesen Ergebnissen, die wiederum einen monoklonalen Ursprung aller eutopen endometrialen Drüsen nahelegen, analysierten wir die Lokalisierung dieser Proteine in der ovariellen, peritonealen und in den tief

infiltrierenden endometriotischen Läsionen. Im Folgenden werden die Hauptergebnisse der drei ausgewählten Marker vorgestellt.

4.3.1 Lokalisation von β -SG im Uterus und in der Endometriose

Das Protein β -SG gehört dem Sarcoglykan Komplex an, bestehend aus α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Sarcoglykan. Es gehört zu einer Gruppe von integralen und Membran-assoziierten Proteinen, die die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden (Anastasi 2010). In der Übersichtsaufnahme kann man das Endometrium in der sekretorischen Zyklusphase sehen (Abb. 19a). Die Drüsen sind überwiegend sägezahnartig vorzufinden. Alle Drüsen im Endometrium sind positiv für β -SG. In der Vergrößerungsaufnahme sieht man wie die überwiegend einschichtigen hochprismatischen epithelialen Drüsenzellen homogen zytoplasmatisch gefärbt sind (Abb. 19b). Die Drüsen weisen eine leichte basale und apikale Betonung auf. Das endometriale Stroma ist weitgehend negativ. Es sind nur vereinzelt Stromazellen perinukleär gefärbt.

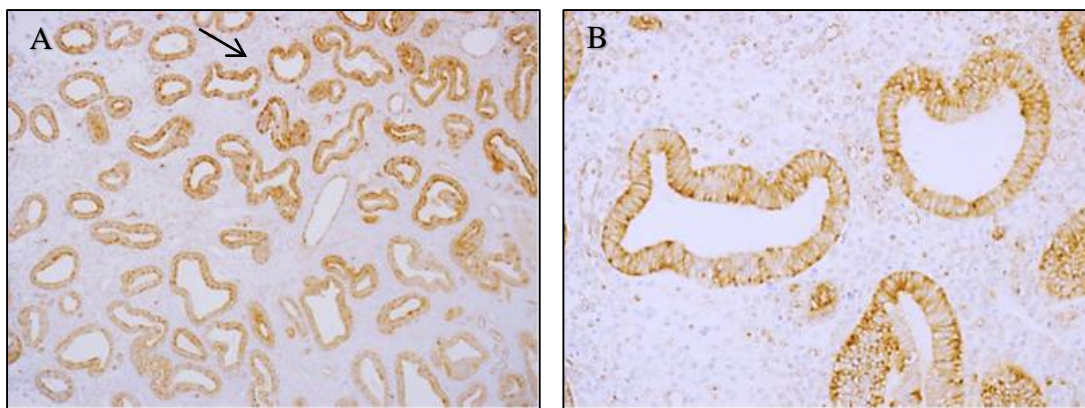


Abb. 19a/b: Immunhistochemischer Nachweis auf einem Gewebeschnitt mit β -SG von einem Uterus myomatosus mit unauffälligem Endometrium in der sekretorischen Zyklusphase. Die Patientin hat im rechten Ovar eine Endometriosezyste. Nachweis von β -SG im Uterus mit 100% gefärbten Drüsen. Abb. 19b stellt die Ausschnittsvergrößerung von Abb. 19a dar (s. Pfeil). Abb. 19a Vergrößerung X4.2 Abb. 19b Vergrößerung X17

Die Detailaufnahmen zeigen ein Uteruspräparat einer Patientin in der Proliferationsphase (Abb. 20a/b). In Abb. 20a sieht man ein Oberflächenepithel mit dem Endometrium, in dem die Drüsenstrukturen eingebettet sind. Das Oberflächenepithel und die Drüsen sind einschichtig hochprismatisch aufgebaut. Das Epithel der Oberfläche sowie das der Drüsen sind zytoplasmatisch gefärbt mit β -SG. Das Oberflächenepithel ist in seiner Färbung intensiver als die benachbarten Drüsen. Es zeigt sowohl eine apikale als auch eine basale Betonung. Das an den Drüsen angrenzende endometriale Stroma ist negativ. Das Stroma im oberen linken Quadranten ist leicht positiv, aufgrund eines Gewebedefekts, welcher als Artefakt anzusehen ist (Abb. 20a, Pfeil). Die Drüsen in Abb. 20b zeigen alle eine einheitliche Färbung mit dem Protein β -SG. Sie sind alle zytoplasmatisch gefärbt und zeigen zum Lumen der Drüsen hin eine kräftigere Färbung. Insgesamt sind die Drüsen in Abb. 20b intensiver als die Drüsen in Abb. 20a gefärbt. Das Stroma in Abb. 20b ist negativ. Beta- Sarcoglykan zeigt bei beiden Patientinnen (Abb. 19 und 20), dass alle Drüsen im Endometrium positiv sind und das Stroma im Endometrium zum erheblichen Teil negativ ist.

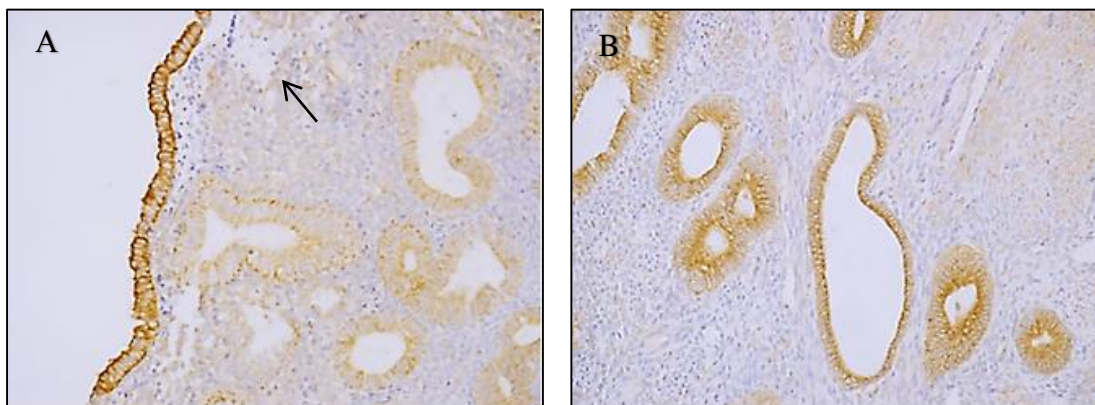


Abb. 20a/b: Uteruspräparat einer Patientin mit physiologischem Endometrium in der Proliferationsphase und Leiomyomen des Corpus uteri. Nachweis von dem Protein β -SG mit 100% gefärbten Drüsen und Oberflächenepithel im Uterus. Der Pfeil in Abb. 20a stellt einen Gewebedefekt dar. Abb. 20a/b Vergrößerung X17

Die folgenden Detailaufnahmen zeigen bei zwei Patientinnen (Abb. 21a und 21b) in ihrer Uterusmuskulatur eine Adenomyose. Beide Patientinnen haben auch Leiomyome im Corpus uteri. Die Patientin zeigt eine Läsion, die partiell einschichtig bis mehrschichtig erscheint aufgrund der Schnittebene (Abb. 21a). Das Epithel ist zytoplasmatisch mit dem Protein β -SG gefärbt und zeigt eine luminale Betonung. Das

angrenzende verdichtete zytogene Stroma ist negativ. Am zytogenen Stroma anliegend ist das Myometrium, welches schwach angefärbt ist. Es ist deutlich ein Unterschied in der Färbeintensität zwischen der Adenomyose und den anliegend lokalisierten Muskelzellen zu sehen. Die herdförmige Adenomyose ist ebenfalls durchgehend zytoplasmatisch gefärbt und zeigt tendenziell eine luminale Betonung (Abb. 21b). Das sich in der Nachbarschaft befindende Stroma ist auch bei dieser Patientin negativ. Das Protein β -SG färbt nicht nur die physiologischen Drüsen im Endometrium, sondern zeigt auch eine ähnliche Färbung bei den pathologischen Adenomyosen im Myometrium des Uterus. Die Muskelzellen werden von β -SG insgesamt leicht gefärbt. Das zytogene Stroma im Uterus hingegen ist bei β -SG frei von Färbung. Die zu 100% gefärbten Drüsen und das in seiner ganzen Zirkumferenz gefärbte Oberflächenepithel im Uterus veranlassen, mit dem Protein β -SG immunhistochemisch weiterzuarbeiten und es in den Entitäten zu analysieren.

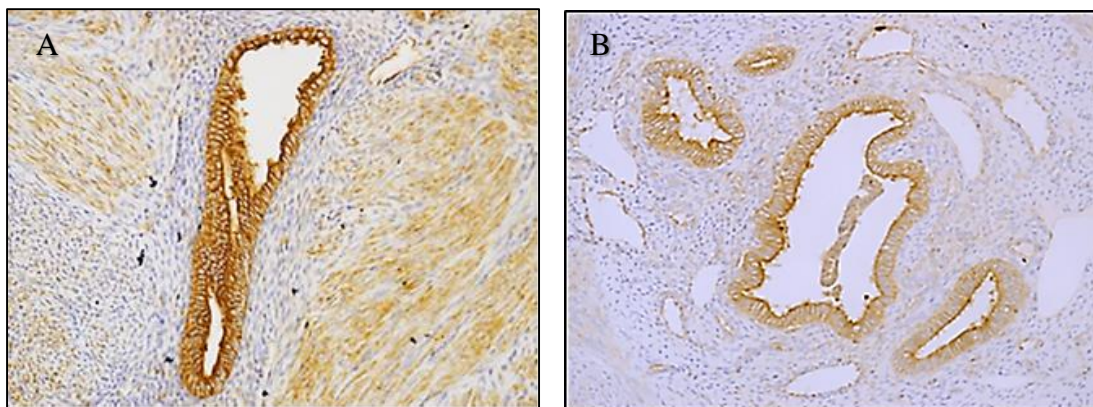


Abb. 21a: Ein Uteruspräparat mit einem immunhistochemischen Nachweis von β -SG in einer Patientin mit ausgeprägter Adenomyosis uteri und Leiomyomen im Corpus uteri.

Abb. 21b: Ein Uteruspräparat mit einer Adenomyose, diffuser Myomatose und kleinen Leiomyomen des Corpus uteri. Immunhistochemischer Nachweis von dem Protein β -SG im Uterus. Es sind bei beiden Patientinnen 100% der Endometrioseherde im Myometrium angefärbt (Abb. 21a/b). Abb. 21a/b Vergrößerung X17

Nachfolgend werden beispielhaft zwei Patientinnen dargestellt, die in ihren Ovarien Endometriosezysten aufweisen (Abb. 22a und 22b). Das Protein β -SG färbt das einschichtige Zystenepithel der Endometriose gleichförmig zytoplasmatisch (Abb. 22a). Das ovarielle Stroma wird von β -SG diffus schwach mitgefärbt. Die Lokalisation der Färbung im Stroma ist gleicherweise zytoplasmatisch. Die Endometriosezyste der

Patientin ist zum größten Teil einschichtig isoprismatisch, bis auf einen kleinen Teil, der mehrschichtig erscheint aufgrund der Schnittebene (Abb. 22b). Das Epithel der Endometriosezyste ist ebenfalls durchgehend zytoplasmatisch gefärbt. Das angrenzende ovarielle Stroma wird von β -SG homogen positiv erfasst. Das Protein β -SG färbt bei beiden Patientinnen das Zystenepithel der Endometriose vollständig zytoplasmatisch (Abb. 22a und 22b). Im Gegensatz zum endometrialen Stroma im Uterus wird zum erheblichen Teil das ovarielle Stroma von β -SG mitgefärbt (vgl. Abb. 20). Da β -SG das Epithel in den Endometrioseherden des Ovars der Patientinnen durchgängig detektiert, wurde das Protein für die weiteren Entitäten (Peritoneum und DIE) eingesetzt.

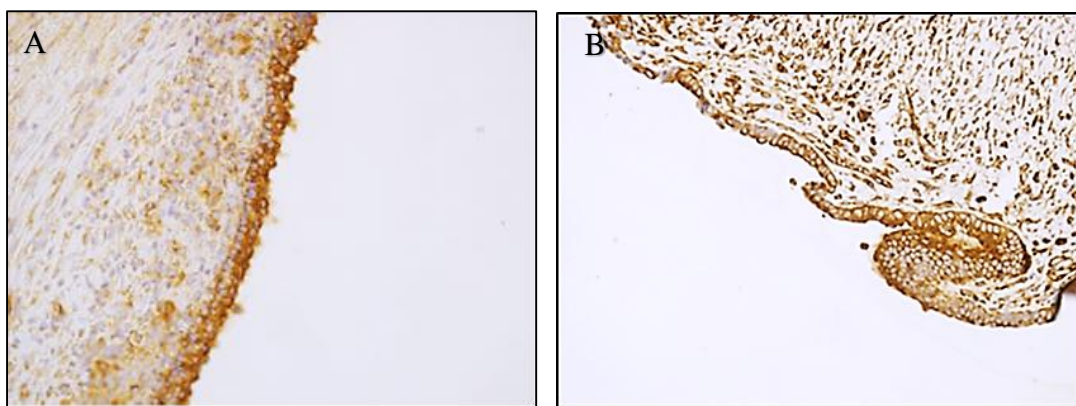


Abb. 22a: Immunhistochemischer Nachweis von β -SG auf einem Schnittpräparat eines Ovars mit fokalen Anteilen einer Endometriose und frischen Blutungsresiduen. Die Patientin hat auch eine Endometriose an den Parametrien, der Fossa ovarica, des Weiteren paraurethral und am Rektosigmoid. **Abb. 22b:** Patientin mit einer Endometriosezyste im Ovar. Nachweis von dem Antikörper β -SG im ovariellen Zystenepithel. Abb. 22a/b Vergrößerung X17

Die nachfolgend vorgestellten Patientinnen haben peritoneale Endometrioseherde im Bereich der Blase (Abb. 23a und 23b). In Abb. 23a kann man einen Teilanschnitt von mehreren mehrschichtigen Drüsenanteilen erkennen, die wegen der tangentialen Schnittführung zustande kommen. Das Epithel der Drüsen ist vollständig positiv. Die Färbung in den Drüsen ist zytoplasmatisch lokalisiert. Das am Epithel angrenzende Stroma ist weitestgehend negativ. Es sind nur vereinzelt kleine Anteile des Stromas zwischen den beiden benachbarten Epithelstrukturen gefärbt (Abb. 23a, Pfeil). Ebenso hat die zweite ausgewählte Patientin eine Läsion mit teils mehrschichtigem Epithel, das aufgrund der Schnittebene entsteht (Abb. 23b). Die Drüse ist in ihrer

ganzen Zirkumferenz zytoplasmatisch gefärbt. Das zytogene Stroma ist nicht gefärbt. In der Umgebung sind minimale Anteile einer schwachen Hintergrundfärbung zu erkennen.

Insgesamt färbt β -SG die Endometriosedrüsen im Peritoneum vollständig und lässt das angrenzende zytogene Stroma aus. Beta- Sarcoglykan zeigt eine nahezu vergleichbare Färbecharakteristik in den Epithelzellen der Drüsen vom Uterus, Ovar und Peritoneum. In allen Drüsen bzw. Zysten sind die Zellen zytoplasmatisch angefärbt. Durch diese Färbesignatur vom Protein β -SG im Peritoneum wurden weitere immunhistochemische Analysen durchgeführt.

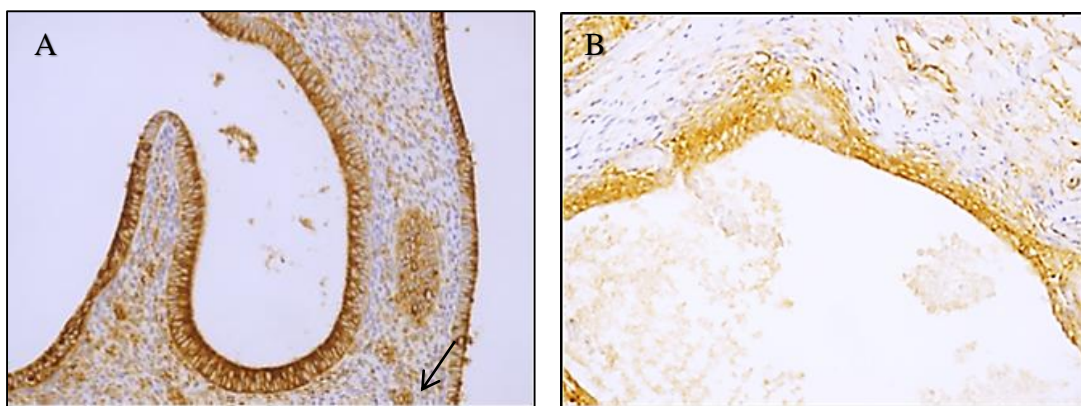


Abb. 23a: Immunhistochemischer Nachweis von β -SG im Präparat einer Blasenendometriose (PE) mit gefäßführendem Fett- und Bindegewebe mit zytogenem Stroma und Einblutungen. Die Patientin hat auch eine Endometriose im Ligamentum rotundum, Ovar und Infundibulum pelvicum. **Abb 23b:** Immunhistochemische Gewebeprobe einer Endometriosepatientin aus dem linken Blasendach (PE) mit Endometrioseinseln, ebenfalls paraurethral und im Ligamentum sakrouterinum. Der Pfeil in Abb. 23a stellt eine Teilfärbung des Stromas dar. Vollständiger Nachweis vom Protein β -SG in peritonealen Endometrioseherden. Abb. 23a/b Vergrößerung X17

Die vorliegenden Gewebeproben sind von zwei Patientinnen mit tief infiltrierenden Endometrioseherden aus der Rektumwand (Abb. 24a) und dem rektovaginalen Bereich (Abb. 24b). Beim Präparat der Rektumwand kann man drei Drüsen sehen, welche von zytogenem Stroma umgeben sind (Abb. 24a). Die Drüsenverbände sind einschichtig isoprismatisch aufgerichtet und weisen ebenfalls eine vollständige Färbung im Zytoplasma auf. Das zytogene Stroma sowie die in der Umgebung lokalisierten Strukturen sind komplett frei von Färbung.

Die zweite Patientin zeigt eine rektovaginale Läsion mit einer einschichtigen isoprismatischen Epithelstruktur und einer lückenlosen Färbung im Zytoplasma (Abb. 24b). Das umgebende zytogene Stroma ist überwiegend frei von Färbung. Die Umgebung ist jedoch schwach gefärbt. Beta- Sarcoglykan zeigt in der rektovaginalen Läsion (Abb. 24b) eine intensivere Färbung als in den Endometrioseinseln aus der Rektumwand (Abb. 24a). Bei beiden Patientinnen ist das zytogene Stroma negativ. Wie auch in den vorherigen dargestellten Gewebearten Uterus, Ovar und Peritoneum (Abb. 19, 22, 23) ist β -SG auch in der tief infiltrierenden Endometriose der Epithelzellen vollends zytoplasmatisch lokalisiert. Insgesamt ist β -SG in allen Drüsen bzw. Zysten zu finden, nicht jedoch im zytogenen Stroma des Uterus, Peritoneums und DIE. Dahingegen ist β -SG im ovariellen Stroma stärker exprimiert als in den Muskelzellen im Uterus. Beta- Sarcoglykan ist das erste entdeckte Protein, welches alle epithelialen Strukturen in den Geweben (Uterus, Ovar, PE und DIE) einbezieht.

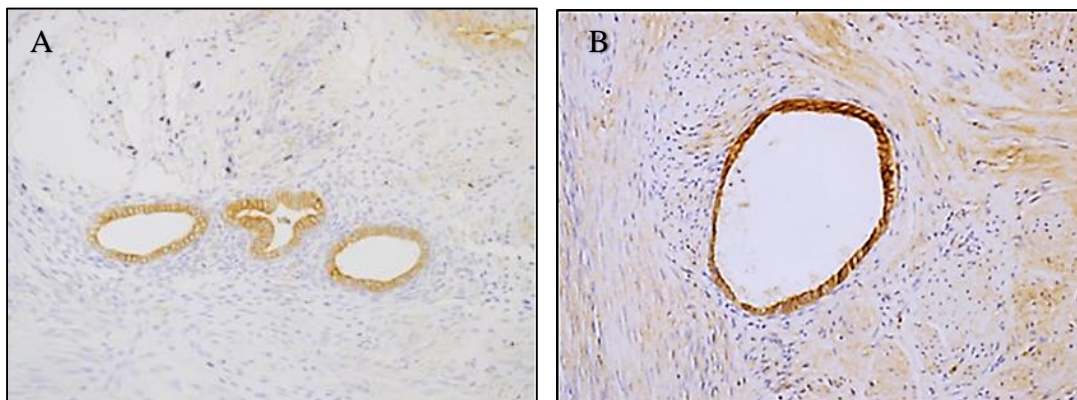


Abb. 24a: Immunhistochemischer Nachweis von einem Gewebeschnitt mit β -SG in einer DIE aus der Rektumwand mit fibrosiertem Gewebe und Anteilen von glatter Muskulatur. **Abb. 24b:** Immunhistochemisches Präparat aus einer rektovaginalen Region mit fibrosiertem Fett und Bindegewebe mit herdförmigem zytogenem Stroma und Endometrioseherden (DIE). Die Patientin hat auch eine Endometriose in der Blasenumschlagsfalte. Nachweis von β -SG in der tief infiltrierenden Endometriose. Abb. 24a/b Vergrößerung X17

4.3.2 Lokalisation von Enpp2 im Uterus und in der Endometriose

Das nächste Protein, welches in den epithelialen Zellen des Endometriums nachgewiesen wurde, ist das Enpp2. Es gehört zu einer Familie, die Phosphodiester-Verbindungen von unterschiedlichen DNA-Bausteinen hydrolysieren (Stefan et al. 2005). In Abb. 25a sieht man eine Übersichtsaufnahme eines Uterusabschnitts mit den Endometriumschichten Funktionalis und Basalis, sowie Anteilen vom Myometrium. Die sich im Endometrium befindenden Drüsen sind in der sekretorischen Zyklusphase. Das Epithel der Drüsen ist hochprismatisch angeordnet. In der Vergrößerungsaufnahme sind die endometrialen Drüsen im Epithel homogen mit einer leichten intensiveren Färbung zur Basis der Epithelzellen hin gefärbt (Abb. 25b). Das Protein Enpp2 ist in allen Drüsen im Endometrium lokalisiert. Es findet sich eine rein zytoplasmatische Färbung in allen Epithelzellen. Das Stroma im Endometrium ist vornehmlich frei von Färbung, bis auf wenige Zellen, die eine schwache perinukleäre Färbung aufweisen. Das Myometrium ist in demselben Maße negativ.

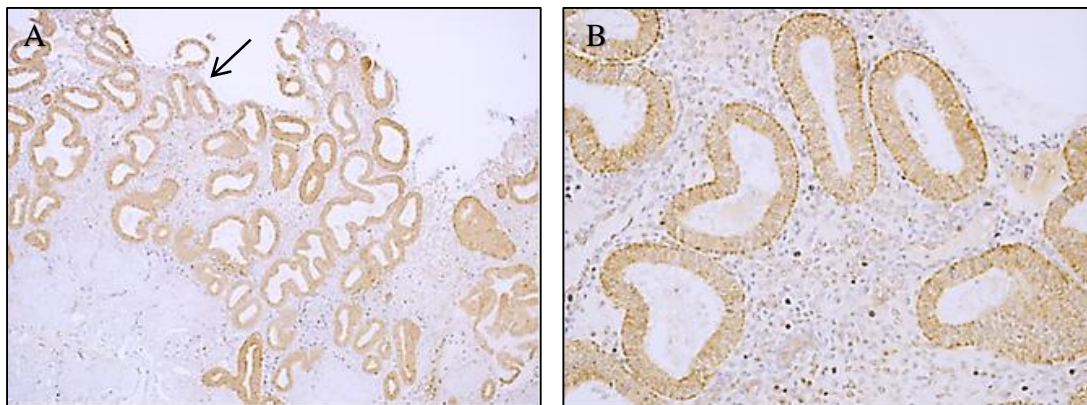


Abb. 25a/b: Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 an einer Patientin mit einem Uterus myomatosus und einem unauffälligem Endometrium in der sekretorischen Zyklusphase. Die Patientin hat im rechten Ovar eine Endometriosezyste. Vollständiger Nachweis des Antikörpers Enpp2 in den epithelialen Drüsen des Endometriums. Abb. 25b stellt die Ausschnittsvergrößerung von Abb. 25a dar (s. Pfeil). Abb. 25a Vergrößerung X4.2 Abb. 25b Vergrößerung X17

Die Abb. 26a und 26b zeigen zwei Detailbilder von einem Uteruspräparat einer Patientin in der Proliferationsphase. In Abb. 26a sieht man ein Oberflächenepithel mit Drüsen im Endometrium. Das Oberflächenepithel und die Drüsen sind einschichtig

hochprismatisch aufgebaut. Das Oberflächenepithel sowie die Drüsen sind mit dem Marker Enpp2 zytoplasmatisch gefärbt. Die Drüsen zeigen eine leicht intensivere Färbung zur Basis der Epithelzellen hin. Das Oberflächenepithel ist in seiner Färbung intensiver als die benachbarten Drüsen. Das an den Drüsen angrenzende endometriale Stroma ist negativ. Auch hier hat der Gewebeschnitt im oberen linken Quadranten einen Gewebedefekt (Abb. 26a, Pfeil).

Die Drüsen in Abb. 26b zeigen alle eine einheitliche zytoplasmatische Färbung mit dem Protein Enpp2 mit einem negativen Stroma. Es ist nur eine schwache Hintergrundfärbung zu sehen. Das Protein Enpp2 erfasst 100% der Drüsen im Uterus und ist im Stroma des Endometriums zum größten Teil negativ, sodass der Marker für weitere Experimente in den Entitäten erprobt wurde.

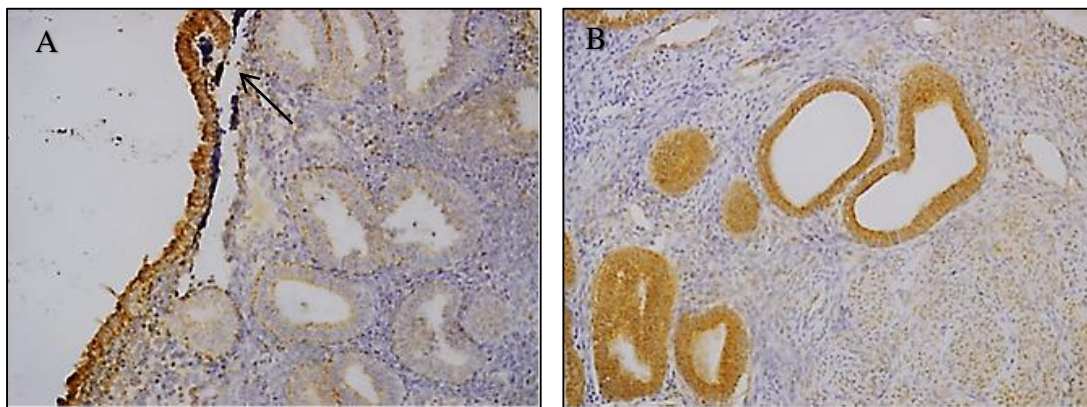


Abb. 26a/b: Uteruspräparat einer Patientin mit physiologischem Endometrium in der Proliferationsphase und Leiomyomen des Corpus uteri. Vollständiger Nachweis des Antikörpers Enpp2 in den Drüsenstrukturen und Oberflächenepithelien der Gebärmutter. In Abb. 26a ist ein Gewebedefekt (s. Pfeil). Abb. 26a/b Vergrößerung X17

Die folgenden Detaileinstellungen sind von zwei Patientinnen, die in ihrer Uterusmuskulatur eine Adenomyose aufweisen (Abb. 27a und 27b). Beide Patientinnen haben auch Leiomyome im Corpus uteri. Die erste Patientin zeigt eine Läsion, die hauptsächlich einschichtig aufgebaut ist (Abb. 27a). Das Epithel ist schwach zytoplasmatisch mit dem Marker Enpp2 gefärbt. Das angrenzende verdichtete zytogene Stroma ist negativ, ebenso wie das anliegende Myometrium. Die zweite Patientin mit dem immunhistochemischen Nachweis der Adenomyose ist ebenfalls durchgehend zytoplasmatisch positiv (Abb. 27b). Das Epithel der Läsion ist einschichtig

isoprismatisch angeordnet. Das anliegende Stroma ist auch bei dieser Patientin negativ. Ein Intensitätsunterschied in der Färbung der Drüsen ist zwischen beiden Patientinnen ersichtlich (vgl. 27a und 27b). Das Protein Enpp2 färbt nicht nur die physiologischen Drüsen im Endometrium, sondern zeigt auch eine ähnliche Färbung bei den pathologischen Adenomyosen im Myometrium des Uterus. Das zytogene Stroma im Uterus ist bei Enpp2 frei von Färbung.

Die zu 100% gefärbten Läsionen mit Enpp2 im Uterus erfüllten die Bedingungen (höchstmögliche Anzahl an gefärbten Epithelzellen, wenige stromale Zellfärbungen und ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis), um mit Enpp2 die Läsionen in den verschiedenen Entitäten quantitativ zu erfassen.

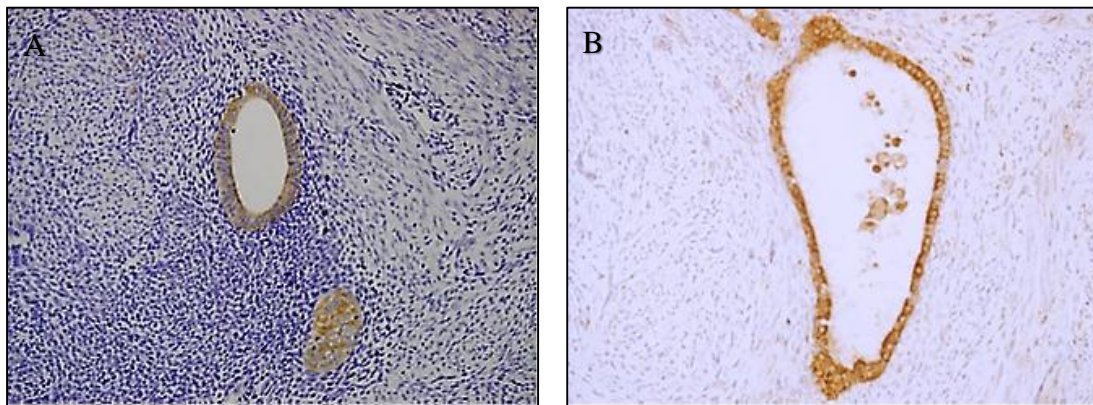


Abb. 27a: Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 an einem Uteruspräparat einer Patientin mit ausgeprägter Adenomyosis uteri und Leiomyomen im Corpus uteri.

Abb. 27b: Uteruspräparat einer Patientin mit einer Adenomyose, diffuser Myomatose und kleinen Leiomyomen des Corpus uteri. Immunhistochemischer Nachweis von Adenomyosen mit dem Antikörper Enpp2 im Uterus. Abb. 27a/b Vergrößerung X17

In der Abb. 28a ist ein Gewebeschnitt eines Ovars dargestellt. Die Aufnahme zeigt einen Anteil einer Endometriosezyste. Das Epithel der Zyste ist einschichtig isoprismatisch gegliedert. Enpp2 ist auf dem Epithel zytoplasmatisch lokalisiert. Es ist eine Färbung zum Lumen der Zyste hin zu erkennen. Das ovarielle Stroma wird von Enpp2 nicht erfasst im Gegensatz zum β -SG im Ovar (vgl. Abb. 22). Die zweite Patientin hat ebenfalls eine Endometriosezyste im Ovar (Abb. 28b). Das Epithel der Zyste ist teilweise einschichtig iso- bis hochprismatisch. Enpp2 färbt hier ebenso das Zytoplasma der Epithelzellen. Das ovarielle Stroma wird von Enpp2 kontinuierlich schwach gefärbt außer dem am Epithel angrenzenden Stroma, welches überwiegend

negativ ist. Insgesamt ist Enpp2 im ovariellen Epithel eher schwächer lokalisiert, im Gegensatz zum Uterus (vgl. Abb. 25, 26, 27).

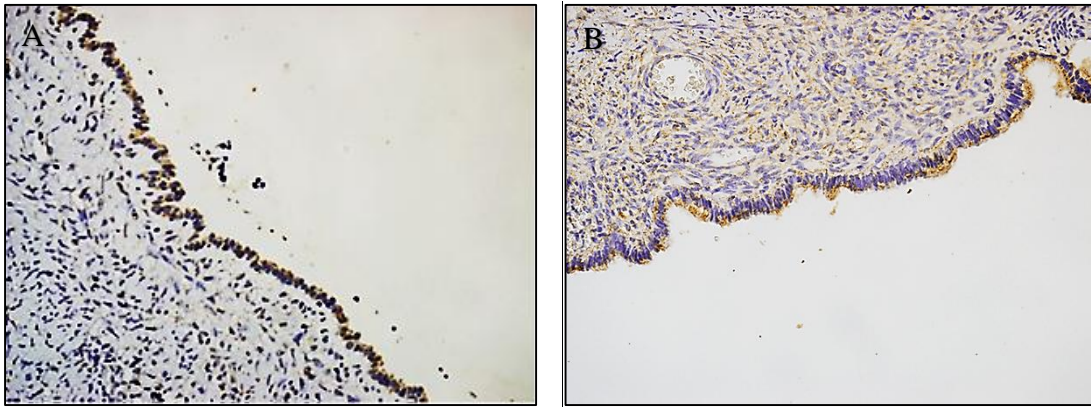


Abb. 28a: Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 bei einer Patientin mit einer Endometriosezyste im Ovar. **Abb. 28b:** Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 bei einer Patientin mit einer ausgebrannten Endometriosezyste im rechten Ovar. Das fragmentierte ovarielle Gewebe hat Oozyten und Primärfollikel. Nachweis des Markers Enpp2 im ovariellen Gewebe. Abb. 28a/b Vergrößerung X17

Die nachfolgenden Patientinnen verfügen über peritoneale Endometrioseherde im Bereich der Blase (Abb. 29a und 29b). In Abb. 29a kann man einen Teil von mehreren mehrschichtigen Drüsenanteilen erkennen, die durch den Anschnitt des Gewebes bedingt sind. Enpp2 färbt das Epithel der Drüsen im Peritoneum vollständig. Die Färbung in den Drüsen ist wie bei β -SG (vgl. Abb. 23a) zytoplasmatisch lokalisiert. Das am Epithel angrenzende Stroma ist negativ. Bei der zweiten Patientin in Abb. 29b sind die Läsionen ebenfalls vollständig zytoplasmatisch gefärbt. Das zytogene Stroma und die sich in der Umgebung befindenden Strukturen sind nicht gefärbt. Insgesamt ist Enpp2 ähnlich wie β -SG in den Endometriosedrüsen im Peritoneum exprimiert und lässt das angrenzende zytogene Stroma aus. Enpp2 zeigt eine vergleichbare Färbemuster vom Protein Enpp2 im Peritoneum erlaubte weitere immunhistochemische Versuche zur Klassifikation der drei Entitäten. Es lässt eine Charakterisierung bzw. Bestimmung des Verwandtschaftsgrads von eutopen Endometriumgewebe zu den ektopen endometriotischen Entitäten zu.

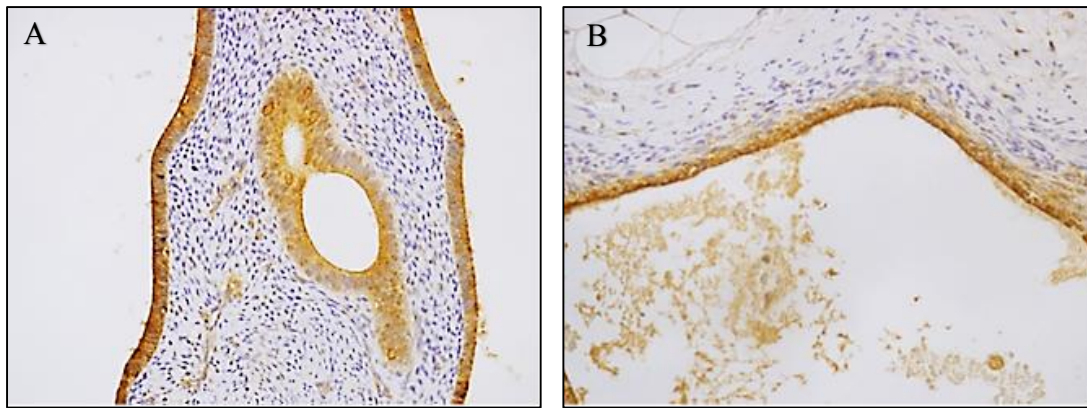


Abb. 29a: Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 im Präparat einer Blasenendometriose (PE) mit gefäßführendem Fett- und Bindegewebe mit zytogenem Stroma und Einblutungen. Die Patientin hat auch eine Endometriose im Ligamentum rotundum, Ovar und Infundibulum pelvicum. **Abb 29b:** Immunhistochemische Gewebeprobe einer Endometriosepatientin aus dem linken Blasendach (PE) mit Endometrioseinseln ebenfalls paraurethral und im Ligamentum sakrouterinum. Vollständiger Nachweis von Enpp2 in der peritonealen Endometriose. Abb. 29a/b Vergrößerung X17

Die Gewebeschnitte sind von zwei Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose aus der Rektumwand (Abb. 30a) und dem rektovaginalen Bereich (Abb. 30b). Bei der ersten Patientin sind die Drüsenverbände größtenteils einschichtig hochprismatisch aufgebaut (Abb. 30a). Enpp2 weist im Epithel ebenfalls eine vollständige Färbung im Zytoplasma auf, die eine zum Lumen hin stärkere Färbung zeigt. Das zytogene Stroma ist schwach gefärbt. Die in der Umgebung lokalisierten Strukturen sind komplett negativ. Die rektovaginale Läsion der zweiten Patientin zeigt auch eine einschichtige hochprismatische Epithelstruktur mit einer durchgängigen Färbung im Zytoplasma (Abb. 30b). Das zytogene Stroma und die Umgebung sind negativ. Enpp2 zeigt in der rektovaginalen Läsion (Abb. 30b) sowie in der Endometriose aus der Rektumwand (Abb. 30a) eine komplette Färbung der Drüsen. Wie auch in den zuvor dargestellten Gewebeproben (Abb. 26, 28, 29) des Uterus, Ovars und PE werden mit Enpp2 in der DIE die Epithelzellen vollständig zytoplasmatisch erfasst. Zusammenfassend ist Enpp2 in allen Drüsen bzw. Zysten der Patientinnen lokalisiert. Das Zystenepithel im Ovar ist im Vergleich zu den Drüsen im Uterus, PE und DIE schwächer gefärbt (Abb. 26, 28, 29, 30). Enpp2 ist im zytogenen Stroma des Uterus, Ovars, Peritoneums und DIE überwiegend nicht lokalisiert, bis auf das zytogene Stroma

in der DIE, welches bei einer Patientin schwach gefärbt ist (Abb. 30a). Das Protein Enpp2 ist das zweite neben β -SG, welches alle epithelialen Strukturen in den Entitäten (Uterus, Ovar, PE und DIE) erfasst.

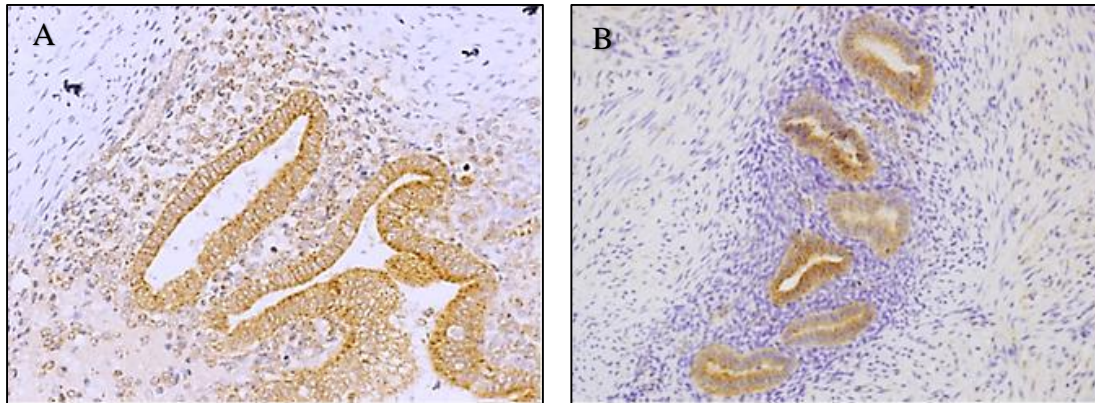


Abb. 30a: Immunhistochemischer Gewebeschnitt mit Enpp2 einer Patientin mit DIE aus der Rektumwand mit fibrosiertem Gewebe und Anteilen glatter Muskulatur.

Abb. 30b: Immunhistochemischer Nachweis von Enpp2 an einer rektovaginalen Region mit fibrosiertem Fett und Bindegewebe mit herdförmigem zytogenem Stroma und Endometrioseherden (DIE). Die Patientin hat auch eine Endometriose in der Blasenumschlagsfalte. Vollständiger Nachweis des Proteins Enpp2 in der DIE. Abb. 30a Vergrößerung X25 Abb. 30b Vergrößerung X17

4.3.3 Lokalisation von Pck2 im Uterus und in der Endometriose

Das dritte zur Analyse verwendete Protein Pck2 ist ein Enzym, welches GTP katalysiert und bei der Umsetzung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat mitwirkt. Das Protein wird in verschiedenen Organen exprimiert, größtenteils in der Leber und Niere (Modaressi et al. 1998).

Die Übersichtsaufnahme in Abb. 31a stellt einen Gebärmutterausschnitt mit den Endometriumschichten Funktionalis und Basalis, sowie Anteilen vom Myometrium dar. Die Drüsen im Endometrium sind in der sekretorischen Zyklusphase. Das Epithel der Drüsen ist hauptsächlich hochprismatisch aufgebaut. In der Vergrößerung in Abb. 31b sind die endometrialen Drüsen im Epithel homogen durch das Protein Pck2 angefärbt. Das Protein Pck2 färbt alle Drüsen im Endometrium ebenso wie die Proteine β -SG und Enpp2 (Abb. 19, 25). Es findet sich eine zytoplasmatische Färbung in den Drüsen. Die

Stromazellen im Endometrium sind schwach gefärbt mit einer leichten perinukleären Färbung. Das Myometrium ist durchgehend negativ.

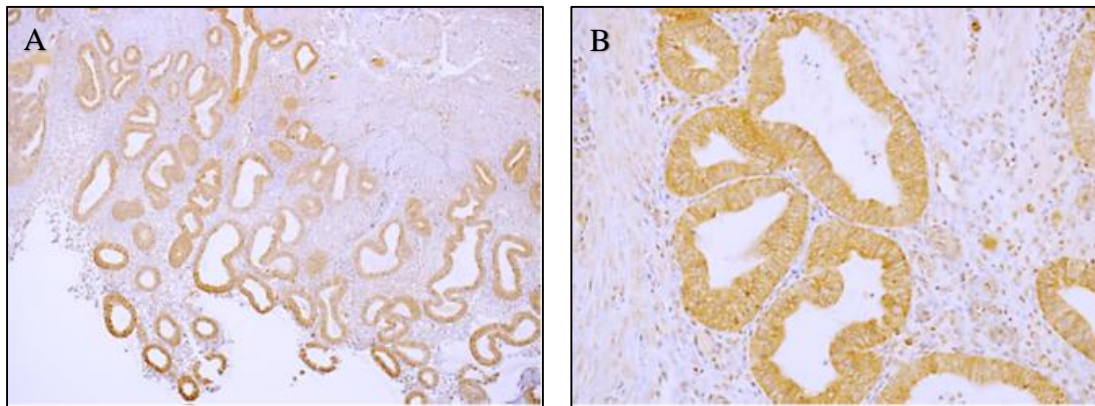


Abb. 31a/b: Immunhistochemischer Nachweis auf einem Gewebeschnitt mit Pck2 eines Uterus myomatosus mit unauffälligem Endometrium in der sekretorischen Zyklusphase. Die Patientin hat im rechten Ovar eine Endometriosezyste. Nachweis von Pck2 in 100% der Drüsen des Uterus. Abb. 31a Vergrößerung X4.2 Abb. 31b Vergrößerung X17

Die Abbildungen 32a/b zeigen ein Uteruspräparat einer Patientin in der Proliferationsphase. In Abb. 32a ist ein Oberflächenepithel mit Drüsen veranschaulicht. Das Oberflächenepithel und die Drüsen sind einschichtig hochprismatisch aufgereiht. Die Drüsen sowie das Oberflächenepithel sind zytoplasmatisch gefärbt. Das Oberflächenepithel ist intensiver als die benachbarten Drüsen gefärbt, ebenso wie bei β -SG und Enpp2 (Abb. 20a, 26a). Insgesamt sind alle Epithelstrukturen homogen positiv. Das endometriale Stroma ist wie bei der vorherigen Patientin (Abb. 31) auch schwach positiv. Es ist auf dem Gewebeschnitt im oberen linken Quadranten ein Gewebedefekt festzustellen (Abb. 32a, Pfeil). Die Drüsen in Abb. 32b sind alle einheitlich mit dem Protein Pck2 gefärbt. Ebenso sind hier alle Drüsen zytoplasmatisch positiv. Das Stroma der Patientin in Abb. 32b ist negativ mit nur einer schwachen Hintergrundfärbung. Das Protein Pck2 ist bei beiden Patientinnen (Abb. 31 und 32) in allen Drüsen im Endometrium lokalisiert. Bei allen Proteinen (β -SG, Enpp2 und Pck2) ist das Oberflächenepithel im Uterus intensiver als die umgebenden Drüsen gefärbt. Das Protein Pck2 erfüllte die Bedingungen (höchstmögliche Anzahl an gefärbten Epithelzellen, wenige stromale Zellfärbungen und ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis), um die Läsionen in den verschiedenen Entitäten quantitativ zu erfassen.

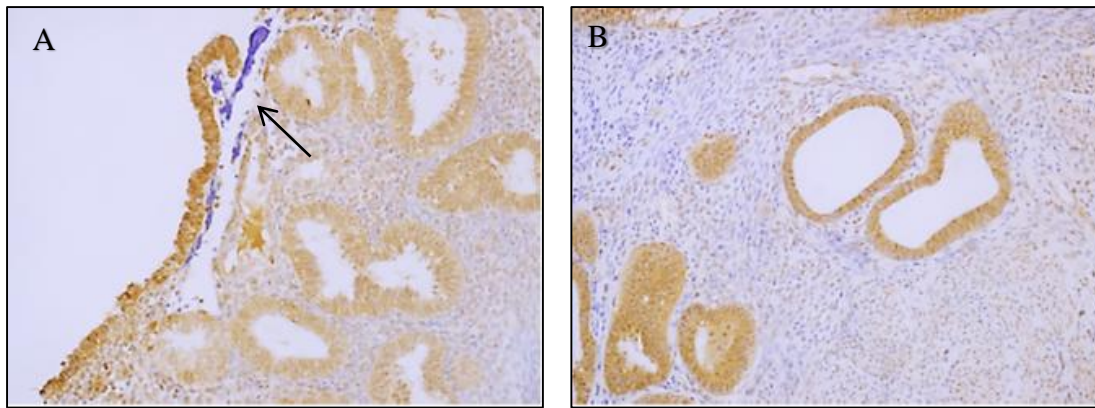


Abb. 32a/b: Uteruspräparat einer Patientin mit physiologischem Endometrium in der Proliferationsphase und Leiomyomen des Corpus uteri. Immunhistochemischer Nachweis von 100% gefärbten Drüsen und Oberflächenepithelien mit dem Protein Pck2. In Abb. 32a ist ein Gewebedefekt (s. Pfeil). Abb. 32a/b Vergrößerung X17

Die nachfolgenden Auflösungen zeigen zwei Patientinnen, welche einen pathologischen Uterus mit Adenomyosen im Myometrium aufweisen (Abb. 33a und 33b). Die erste Patientin zeigt eine Läsion, die einschichtig hochprismatisch aufgebaut ist (Abb. 33a). Das Epithel ist stark zytoplasmatisch gefärbt. Das angrenzende verdichtete zytogene Stroma ist negativ. Um das zytogene Stroma herum ist das Myometrium, welches schwach angefärbt ist.

Die zweite Patientin mit der Adenomyose ist ebenfalls durchgehend mit Pck2 zytoplasmatisch gefärbt (Abb. 33b). Das Epithel der Läsion ist einschichtig isoprismatisch aufgebaut. Das zytogene Stroma ist ebenfalls negativ. Auch bei diesen Patientinnen (Abb. 33a/b) ist für Pck2 ein Intensitätsunterschied in der Färbung zu erkennen (vgl. 27a und 27b). Das Protein Pck2 ist wie β -SG und Enpp2 nicht nur in den physiologischen Drüsen im Endometrium exprimiert, sondern zeigt ein vergleichbares Färbemuster bei den pathologischen Adenomyosen im Myometrium des Uterus. Das zytogene Stroma im Uterus ist bei Pck2 negativ.

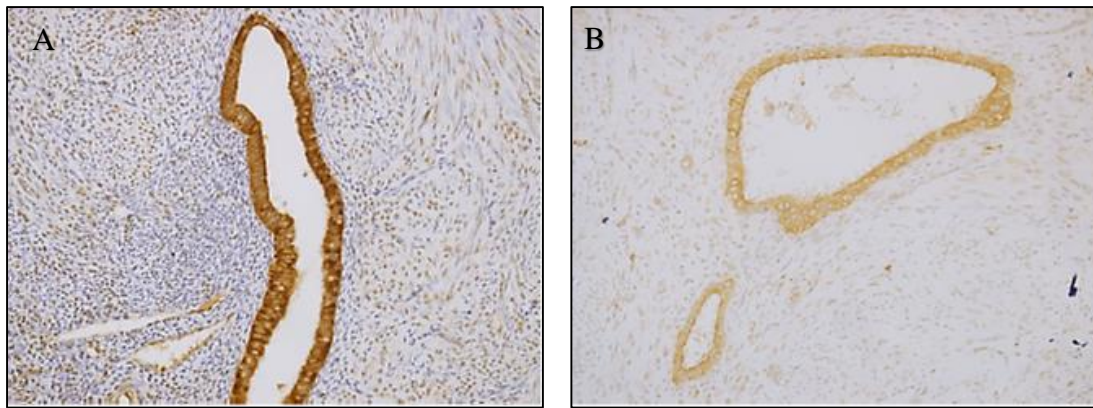


Abb. 33a: Uteruspräparat einer Patientin mit ausgeprägter Adenomyosis uteri und Leiomyomen im Corpus uteri. **Abb. 33b:** Uteruspräparat einer Patientin mit einer Adenomyose, diffuser Myomatose und kleinen Leiomyomen des Corpus uteri. Immunhistochemischer Nachweis mit 100% gefärbten Adenomyosen mit dem Antikörper Pck2. Abb. 33a/b Vergrößerung X17

Die folgenden zwei Patientinnen haben in ihren Ovarien Endometriosezysten (Abb. 34a und 34b). Das Protein Pck2 färbt das Zystenepithel der Endometriose gleichförmig zytoplasmatisch (Abb. 34a). Das Epithel der Zyste zeigt eine luminale Betonung der Färbung. Eine schwache Hintergrundfärbung ist im ovariellen Stroma vorhanden. Die Endometriosezyste der zweiten Patientin ist zum größten Teil einschichtig isoprismatisch, bis auf einen kleinen Teil, welcher mehrschichtig aufgrund der Schnittebene ist (Abb. 34b). Das Epithel der Endometriosezyste ist ebenso durchgehend zytoplasmatisch gefärbt. Das umliegende ovarielle Stroma wird von Pck2 schwach positiv markiert. Das Protein Pck2 färbt bei beiden Patientinnen das Zystenepithel der Endometriose vollständig zytoplasmatisch (Abb. 34a und 34b). In der Intensität färbt Pck2 das Epithel stärker als Enpp2 (vgl. Abb. 28). Pck2 färbt das ovarielle Stroma nicht so kräftig wie β -SG (vgl. Abb. 22). Das Epithel in den Endometrioseherden des Ovars der Patientinnen wurde durch Pck2 vollständig detektiert, weshalb mit dem Protein weitere quantitative Untersuchungen vorgenommen wurden.

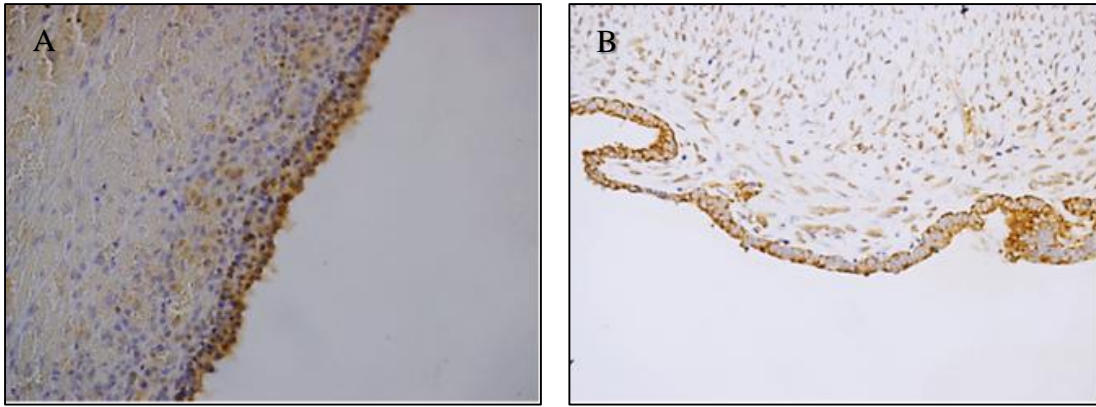


Abb. 34a: Immunhistochemischer Nachweis von Pck2 in einem Schnittpräparat eines Ovars mit fokalen Anteilen einer Endometriose und frischen Blutungsresiduen. Die Patientin hat auch eine Endometriose an den Parametrien, der Fossa ovarica, des Weiteren paraurethral und am Rektosigmoid. **Abb. 34b:** Patientin mit einer Endometriosezyste im Ovar. Immunhistochemischer Nachweis von Pck2 im ovariellen Gewebe. Abb. 34a/b Vergrößerung X17

Bei den nachfolgenden Gewebeproben handelt es sich um Patientinnen mit peritonealen Endometrioseherden im Bereich der Blase und des Ligamentum sakrouterinum (Abb. 35a und 35b). Die Abb. 35a stellt Anschnitte von mehreren Drüsenanteilen dar. Pck2 färbt das Epithel der Drüsen gänzlich, ähnlich wie β -SG und Enpp2 bei den Patientinnen (Abb. 23a und 29a). Die Färbung in den Drüsen ist zytoplasmatisch lokalisiert. Das zytogene Stroma um das Epithel ist negativ. Die am Rande gelegenen einzelgruppierten Stromazellen sind schwach positiv. Die zweite Patientin hat zwei Läsionen mit einschichtigem Epithel (Abb. 35b). Das Epithel der linken Läsion ist nur teilweise erhalten. Die Drüsen sind vollständig zytoplasmatisch gefärbt. Das zytogene Stroma ist negativ. In der peripheren Umgebung ist eine minimale Hintergrundfärbung zu erkennen. Insgesamt ist Pck2 genau wie β -SG und Enpp2 in der Endometriose im Peritoneum vollständig lokalisiert und lässt das angrenzende zytogene Stroma aus. Das Protein Pck2 zeigt eine vergleichbare Färbecharakteristik in den Epithelzellen der Drüsen vom Uterus, Ovar und Peritoneum. In allen Drüsen bzw. Zysten sind die Zellen zytoplasmatisch angefärbt. Diese Färbeeigenschaft in den Epithelzellen des Peritoneums ließ das Protein Pck2 für weitere immunhistochemische Experimente geeignet erscheinen.

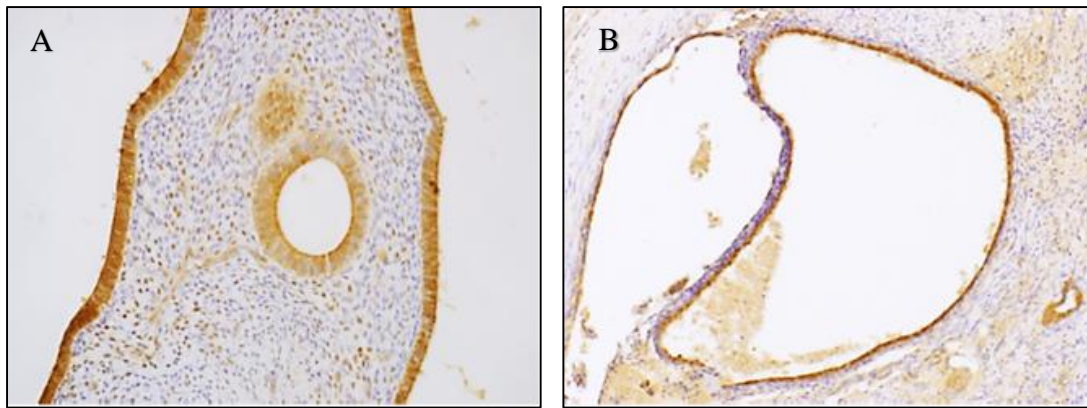


Abb. 35a: Immunhistochemischer Nachweis von Pck2 bei einer Patientin mit Blasenendometriose (PE) mit gefäßführendem Fett- und Bindegewebe mit zytogenem Stroma und Einblutungen. Die Patientin hat auch eine Endometriose im Ligamentum rotundum, Ovar und Infundibulum pelvicum. **Abb. 35b:** Immunhistochemischer Nachweis an einer peritonealen Endometriose am Ligamentum sakrouterinum mit teilweise vernarbtem Weichgewebe. Es sind mehrere Zysten mit endometrialem Stroma vorhanden. Vollständiger Nachweis von Pck2 bei beiden Patientinnen mit peritonealer Endometriose. Abb. 35a Vergrößerung X 17 Abb. 35b Vergrößerung X12

Nachfolgend sind zwei Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose aus der Rektumwand (Abb. 36a) und ein rektovaginales Resektat (Abb. 36b) dargestellt. Die erste Patientin hat Drüsenstrukturen, die einschichtig hochprismatisch angeordnet sind (Abb. 36a). Im Epithel weist Pck2 wie β -SG und Enpp2 (Abb. 24a und Abb. 30a) eine zytoplasmatische Färbung auf. Das zytogene Stroma ist überwiegend negativ bis auf einige schwach gefärbte Stromazellen.

Die rektovaginale Läsion der zweiten Patientin ist ebenfalls einschichtig hochprismatisch angeordnet (Abb. 36b). Das Protein Pck2 ist auch bei dieser Patientin im Zytoplasma durchgängig lokalisiert. Die zytogenen Stromazellen und die Umgebung sind negativ. Das Protein Pck2 weist in der rektovaginalen Läsion (Abb. 36b) sowie in den Endometriose aus der Rektumwand (Abb. 36a) eine ganzheitliche Färbung der Drüsen auf. Genau wie in den Gewebeproben des Uterus, Ovars und PE (Abb. 31, 34, 35) erfasst Pck2 in der DIE die Epithelzellen vollständig. Das Protein Pck2 ist beim zytogenen Stroma im Uterus, Ovar, Peritoneum und DIE stärker exprimiert als Enpp2. Somit war Pck2 das dritte Protein neben β -SG und Enpp2, welches alle epithelialen Strukturen der Entitäten (Uterus, Ovar, PE und DIE) erfasste.

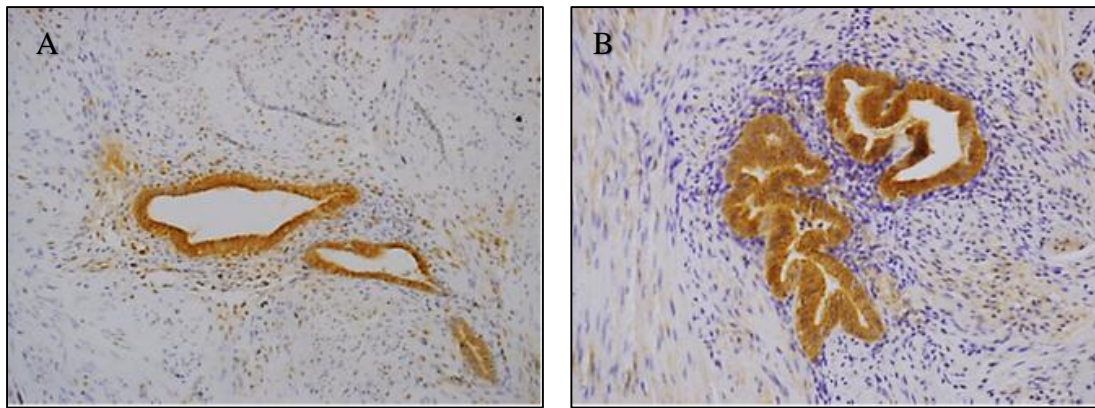


Abb. 36a: Immunhistochemischer Nachweis mit Pck2 bei einer Patientin mit einer DIE aus der Rektumwand mit fibrosiertem Gewebe und Anteilen glatter Muskulatur.

Abb. 36b: Immunhistochemisches Präparat einer rektovaginalen Region mit fibrosiertem Fett und Bindegewebe mit herdförmigem zytogenem Stroma und Endometrioseherden (DIE). Die Patientin hat auch eine Endometriose in der Blasenumschlagsfalte. Die Drüsen der DIE sind zu 100% gefärbt mit dem Antikörper Pck2. Abb. 36a/b Vergrößerung X17

Für das quantitative Vorgehen wurden die ausgewählten Marker (β -SG, Enpp2 und Pck2) im Endometrium und in der Endometriose untersucht. Es erfolgte die Bestimmung an Ausschnitten der jeweiligen Präparate von denen die Drüsen nacheinander bezüglich der Quantität der gefärbten Zellen in Prozent abgeschätzt wurden (Tab. 24).

Für die Entitäten Uterus, Ovar, Peritoneum und DIE wurde exakt dieselbe Auszählungsmethode und Prozentbestimmung in Bezug auf die Färbungen der einzelnen Schnitte vorgenommen. Es wurde für die angefärbten Drüsen und Zysten mit den drei Markern ein Mittelwert in Prozent mit dem Standardfehler bestimmt. Die Tab. 24 zeigt die Anzahl der untersuchten Patientinnen der jeweiligen Entität mit den drei Proteinen sowie die Anzahl der Läsionen in Klammern für das PE und die DIE. Das Endometrium wurde jeweils mit den drei Entitäten (DIE, PE und Ovar) verglichen und der P-Wert bestimmt.

Das Ziel war es, wie in der anschließenden Übersichtstabelle 24 dargestellt, den Grad der Übereinstimmung der endometriotischen Entitäten DIE, PE und Ovar zum Endometrium, sowie die prozentualen Anteile der gefärbten Drüsen im Endometrium und in den endometriotischen Läsionen für die gewebspezifischen Marker β -SG, Enpp2 und Pck2 zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, ganzheitlich betrachtet, dass die

drei Proteine nahezu 100% der Drüsen im Endometrium färben. Es lässt sich eine hohe Übereinstimmung zwischen Endometrium und DIE (95,7%) zeigen, welche auf einen engen Verwandtschaftsgrad schließen lässt. Das Endometrium und PE (84,1%) haben ebenfalls eine hohe Übereinstimmung. Das Endometrium und Ovar (68,7%) zeigen eine schwächere Übereinstimmung. Die DIE und das PE haben höhere Gemeinsamkeiten untereinander als jeweils zum Ovar.

Tab. 24: Prozentsatz gefärbter Drüsen im Endometrium und den endometriotischen Entitäten für β -SG, Enpp2 und Pck2.

		Endometrium ohne Endometriose (a)	Ovarielle Endometriose (b)	Peritoneale Endometriose (c)	DIE (d)
β-SG	N	23	19	19 (30)	18 (19)
	Mittelwert (%)	100	84,4	89	99,6
	SEM	0	4,9	3,5	0,44
	P		P(ab)=0,01 P(bd)=0,05	P(ac)=0,001 P(cd)=0,001	P(ad)=n.s.
Enpp2	N	23	16	18 (26)	18 (19)
	Mittelwert (%)	98	56	77,7	88,9
	SEM	2	9,5	3,6	5,9
	P		P(ab)=0,001 P(bd)=0,01	P(ac)=0,001 P(cd)=0,05	P(ad)=n.s.
Pck2	N	23	15	17 (25)	19 (20)
	Mittelwert (%)	100	62,4	85	98,5
	SEM	0	9	3,2	0,8
	P		P(ab)=0,001 P(bd)=0,01	P(ac)=0,001 P(cd)=0,001	P(ad)=n.s.
Σ	N	69	50	54 (81)	55 (58)
	Mittelwert (%)	99,3	68,7	84,1	95,7
	SEM	0,7	4,7	2	2
	P		P(ab)=0,001 P(bd)=0,01	P(ac)=0,001 P(cd)=0,05	P(ad)=n.s.

Die Mittelwerte der gefärbten Drüsen sind in % angegeben; n= Anzahl der Patientinnen mit der Anzahl der Läsionen in Klammern; SEM= Standardfehler; DIE= tief infiltrierende Endometriose; P(ab) steht für P-Wert des Endometriums ohne endometriotische Läsionen verglichen mit der ovariellen Endometriose (b). n.s.= nicht signifikant

4.4 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 im Endometrium

Die unten dargestellten immunhistochemischen Nachweise sind Serienschnitte einer Patientin mit den drei ausgewählten Proteinen (Abb. 37). Die Marker β -SG, Enpp2 und Pck2 zeigten eine starke Lokalisierung in den Drüsen des Endometriums und den Oberflächenepithelzellen. Alle Epithelzellen im Uterus waren bei den drei Proteinen vollständig gefärbt. Die Drüsen aus dem Endometrium von der Patientin befanden sich in der Proliferationsphase (Abb. 37). Alle Marker zeigten eine homogene Färbung (Abb. 37). Die Epithelzellen waren größtenteils einschichtig hochprismatisch aufgebaut. Beim Protein β -SG waren die Drüsen deutlich luminal betont, wohingegen bei Enpp2 und Pck2 die Drüsen nur leicht ansatzweise luminal betont waren. Das Stroma des Endometriums war bei β -SG und Enpp2 komplett negativ. Pck2 zeigte eine schwache Hintergrundfärbung mit einzelnen positiven Stromazellen in der Peripherie. Insgesamt waren die drei Marker in der Lokalisation der epithelialen Zellen des Uterus identisch. Es zeigten sich auch keine Unterschiede im Färbemuster der drei Proteine zwischen physiologischem Endometrium und den Adenomyosen (Abb. 21, 27 und 33).



β -SG

Enpp2

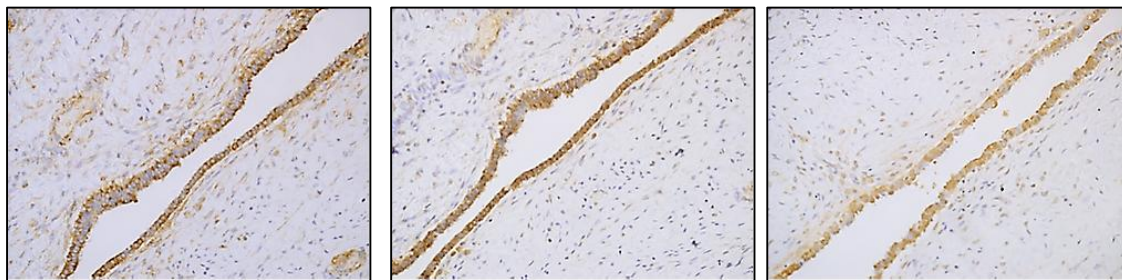
Pck2

Abb. 37: Immunhistochemischer Nachweis an einem Uteruspräparat einer Patientin in der Proliferationsphase des Endometriums. Bei der Patientin sind mehrere Leiomyome im Corpus uteri vorhanden. Die Patientin hat eine Endometriose am Ligamentum sakrouterinum beidseits. Vergrößerung X17

4.5 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der ovariellen Endometriose

Für das ovarielle Gewebe als eigenständige Entität wurde ebenfalls ein Serienschnitt einer Patientin für die drei Marker verwendet. Die Patientin hatte eine Endometriosezyste im linken Ovar (Abb. 38). Die Zystenanteile wurden von allen Proteinen vollständig detektiert. Das Zystenepithel war einschichtig isoprismatisch bei den Serienschnitten mit β -SG, Enpp2 und Pck2 aufgebaut. Alle Marker ähnelten sich in ihrer zytoplasmatischen Färbung. In der Stärke der Färbung der Zyste waren β -SG und Enpp2 etwas intensiver als Pck2. Das ovarielle Stroma war bei der Patientin weitestgehend negativ. Das zytogene Stroma war ebenso negativ, jedoch nur marginal vorhanden.

Vergleichend war das ovarielle Stroma bei dieser Patientin mit β -SG negativ im Gegensatz zu den anderen Patientinnen (vgl. Abb. 22a/b). Ebenfalls fiel für Enpp2 auf, dass das Zystenepithel deutlich intensiver gefärbt war, als bei den vorherigen Patientinnen (vgl. Abb. 28a/b).



β -SG

Enpp2

Pck2

Abb. 38: Immunhistochemischer Nachweis an einer Patientin mit einer Endometriosezyste mit Stroma und Blutungsresiduen aus dem linken Ovar. Die Patientin hat auch eine Endometriose im Sigma, Rektum und Ligamentum sakrouterinum. Vergrößerung X17

Abschließend betrachtet zeigte sich im Vergleich zum Uterusepithel eine schwächere Lokalisation innerhalb des Ovars für β -SG, Enpp2 und Pck2. Ungefähr zwei Drittel der ovariellen Läsionen waren positiv für die drei Marker. Im Laufe der Experimente konnte bei allen Patientinnen mit ovarieller Endometriose für die drei Marker kein einheitliches Muster in Bezug auf den Färbegrad aufgezeigt werden. In der o.a. Tab. 24 ist die prozentuale Färbung der Läsionen durch die Proteine im Ovar aufgeführt.

4.6 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der peritonealen Endometriose

In Abb. 39 wird eine peritoneale Endometriose einer Patientin aus dem Ligamentum sakrouterinum dargestellt. Das Drüsenepithel war einschichtig isoprismatisch angeordnet. Bei allen Markern stellte sich die Färbung der Läsion einheitlich zytoplasmatisch dar. Das zytogene Stroma um die Drüsen herum war bei allen Proteinen ungefärbt. Das in der Peripherie liegende Gewebe war bei Enpp2 und Pck2 überwiegend negativ. Beim β -SG dargestellten Schnitt konnte man eine leichte Hintergrundfärbung erkennen (Abb. 39, Pfeil). Das Muster der Färbung bei dieser Patientin durch die drei Proteine ähnelte dem der anderen Patientinnen (Abb. 23, 29, 35).

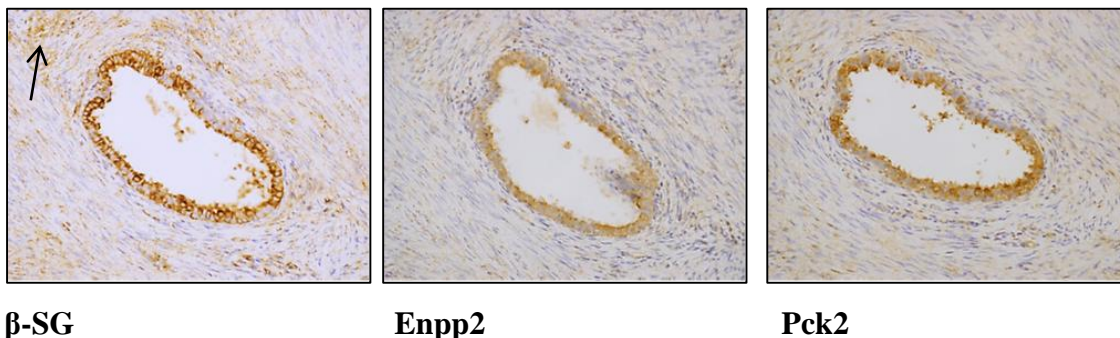
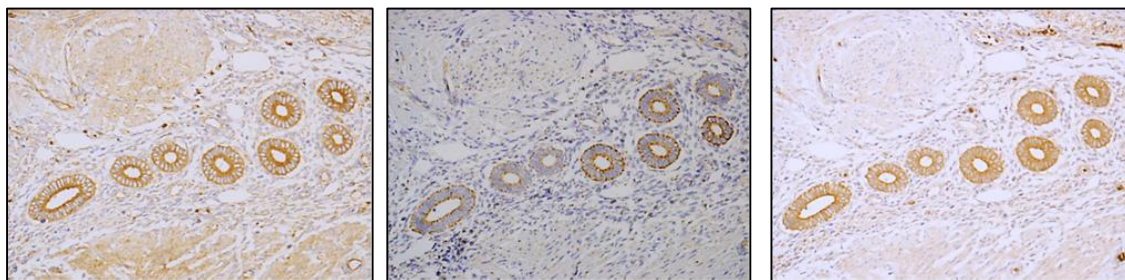


Abb. 39: Immunhistochemischer Nachweis einer Patientin mit einer peritonealen Endometriose aus dem Ligamentum sakrouterinum links. Es sind Anteile von Endometriosezysten und Blutungsresiduen vorhanden. Die Patientin hat auch eine Endometriose im Ligamentum rotundum, Fossa ovarica und Ovar. Der Pfeil bei β -SG in Abb. 39 stellt eine Hintergrundfärbung dar. Vergrößerung X17

Zusammenfassend stellten sich die Proteine in der peritonealen Endometriose im Laufe der Versuche mit dem Grad der Färbung und Lokalisation homogener dar als in der ovariellen Endometriose. Ungeachtet dessen wurden nicht alle Läsionen im Peritoneum durch β -SG, Enpp2 und Pck2 erfasst. Die o.a. Tab. 24 stellt die Ergebnisse der Drüsenfärbung prozentual dar.

4.7 Übersicht von β -SG, Enpp2 und Pck2 in der tief infiltrierenden Endometriose

Die in Abb. 40 dargestellten Drüsenformationen entsprechen einer tief infiltrierenden Endometriose aus dem Dickdarmbereich. Es handelte sich um eine Patientin mit einem multifokalem Befall. Alle drei immunhistochemischen Präparate stellten einen exakten Serienschnitt dar. Das Epithel war bei den kleinlumigen Drüsenanschnitten einschichtig hochprismatisch. Die drei Schnitte waren durchgängig positiv mit den Markern. Die Färbung war zytoplasmatisch lokalisiert, wie auch bei den anderen Patientinnen mit tief infiltrierender Endometriose (Abb. 24, 30, 36). Das Färbemuster zeigte bei β -SG eine leicht luminale Betonung. Bei Enpp2 war die Intensität der Färbung im Vergleich zu den anderen beiden Proteinen schwächer ausgeprägt und nur basal und luminal lokalisiert. Das zytogene Stroma, in dem die Drüsen eingebettet waren, war bei allen Patientinnen negativ. Das in der Peripherie gelegene Gewebe war bei Enpp2 und Pck2 negativ. Nur β -SG färbte die Muskelzellen leicht, wie auch zuvor im Uterus (Abb. 21a).



β -SG

Enpp2

Pck2

Abb. 40: Immunhistochemischer Nachweis von β -SG, Enpp2 und Pck2 bei einer Patientin mit einer tief infiltrierenden Endometriose aus dem Dickdarmbereich.
Vergrößerung X17

Insgesamt zeigten die Proteine β -SG, Enpp2 und Pck2 bei allen DIE- Patientinnen ein sehr homogenes Muster bezüglich der Färbung und Lokalisation.

Die Färbecharakteristika bei den Gewebeproben ähnelten sehr stark dem des Endometriums. Die o.a. Tab. 24 stellt die Ergebnisse aller Patientinnen aus der tief infiltrierenden Endometriose für die drei Proteine dar.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Das Ziel der Untersuchung war es, mit Hilfe von gewebspezifischen Markern, Unterschiede und Übereinstimmungen des Endometriums und der endometriotischen Läsionen zu bestimmen. In der Studie wurden für die Analyse der immunhistochemischen Lokalisierung endometriale Biopsien von Patienten mit und ohne Endometriose verwendet. In den meisten Fällen wurden Serienschnitte genutzt. Es wurde anfänglich mit sieben Proteinen gearbeitet (Pace4, Gsk3 β , CD9, WDR13, β -SG, Enpp2 und Pck2). Für drei von den sieben Proteinen (β -SG, Enpp2 und Pck2) konnte eine Expression in nahezu allen endometrialen Drüsen und Epithelien mit 99,3% festgestellt werden bei einer Gesamt- Gewebeprobenanzahl von 69.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse haben wir die Lokalisierung und die Quantifizierung der drei Proteine (β -SG, Enpp2 und Pck2) und damit eine Charakterisierung der drei Entitäten; der ovariellen Endometriose; der peritonealen Endometriose und der tief infiltrierenden Endometriose vornehmen können.

Die Proteinexpression der Läsionen aller tief infiltrierenden Endometriosen waren für β -SG 99,6%, Enpp2 88,9% und Pck2 98,5% und somit zusammenfassend in der tief infiltrierenden Endometriose 95,7% bei einer Gesamtzahl an Patientinnen von 55 mit 58 Läsionen. Die endometriotischen Drüsen und fast alle endometriotischen Epithelzellen aller peritonealen Läsionen in den Serienschnitten zeigten eine Proteinexpression für Enpp2 von 77,7%, für β -SG von 89% und für Pck2 von 85% und somit insgesamt 84,1% in der peritonealen Endometriose bei einer Gesamt- Patientinnenanzahl von 54 mit 81 Läsionen. Die Läsionen in der ovariellen Endometriose zeigten eine Gesamtpositivität bei β -SG von 84,4%, bei Enpp2 von 56% und bei Pck2 von 62,4% und somit für alle drei Proteine zusammengenommen in der ovariellen Endometriose von 68,7% bei einer Gesamt-Gewebeprobenanzahl von 50.

Für die beiden Entitäten, dem Endometrium und der tief infiltrierenden Endometriose wurde ein sehr hoher Prozentsatz an positiven Drüsenstrukturen erfasst, was eine sehr hohe Übereinstimmung vermuten lässt. Die Proteinexpression in den eutopen endometrialen Drüsen und in der peritonealen Endometriose zeigte ebenfalls eine große Übereinstimmung. Für die dritte Entität, der ovariellen Endometriose verglichen mit den eutopen endometrialen Drüsen, zeigte die Proteinexpression von β -SG, Enpp2 und Pck2 eine schwächere Übereinstimmung. Es kann daher eine mögliche Rangfolge für

den Grad der Übereinstimmung der drei endometriotischen Entitäten (DIE, PE und Ovar) verglichen mit den eutopen endometrialen Drüsenstrukturen aufgestellt werden. An erster Stelle kommt für den Grad der Übereinstimmung mit dem Endometrium die DIE, gefolgt von den peritonealen endometriotischen Läsionen und schließlich die ovarielle Endometriose. Für die Vergleiche untereinander der drei Entitäten DIE, Peritoneum und Ovar ist zu erwähnen, dass die tief infiltrierende Endometriose und die peritoneale Endometriose miteinander eine größere Ähnlichkeit aufweisen, als zur ovariellen Endometriose.

5.2 Analyse der Marker β - SG, Enpp2 und Pck2

5.2.1 Analyse von β - SG

Das Protein β - Sarcoglykan ist Teil eines großen Komplexes, der aus einer Vielzahl an Molekülen besteht (Abb. 41). Die größte Einheit ist der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex; diesem gehören eine Reihe von Proteinen an wie z.B. der Sarcoglykan-Komplex mit seiner Untereinheit β - Sarcoglykan (Hashimoto und Yamaguchi 2006). Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex hat sowohl eine mechanisch stabilisierende als auch eine signal- vermittelnde Funktion zwischen dem Zytoskelett, der Membran und der extrazellulären Matrix (Lapidos et al. 2004). Der Sarcoglykan- Komplex besteht aus verschiedenen Isoformen (Abb. 41). Während die β -, δ - und ϵ -Sarcoglykane in vielen Geweben vorkommen, sind γ - und α -Sarcoglykane ausschließlich im Skelett- und Herzmuskel exprimiert (Cutroneo et al. 2014). Das Protein β - Sarcoglykan ist am häufigsten in Herz- und Skelettmuskelgewebe, aber auch in Plazenta, Niere, Leber und der Lunge vorzufinden (Anastasi et al. 2007). Die Sarcoglykane werden mit muskuloskelettalen Erkrankungen in Verbindung gebracht, so verursacht eine Störung im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex oftmals eine Muskeldystrophieerkrankung (McNally 2012). Ebenfalls können spezielle Mutationen im Sarcoglykan- Komplex eine Kardiomyopathie verursachen (Wheeler und McNally 2003).

Der Sarcoglykan-Komplex spielt nicht nur an den Membranen und am Sarkolemm der Muskelfasern eine Rolle, sondern konnte auch in Epithelzellen und in verschiedenen Gewebearten vorgefunden werden (Anastasi 2010), wie die glatte Muskulatur von Bronchiolen, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Blase, Harnleiter und dem Uterus

(Anastasi et al. 2007).

Im gesunden weiblichen Brustgewebe konnten auch nahezu alle Sarcoglykan-Isoformen in Epithel- und Myoepithelzellen identifiziert werden (Arco et al. 2012). Im benignen Prostatagewebe fand man ebenso alle Sarcoglykane in den epithelialen und myoepithelialen Strukturen (Cutroneo et al. 2014).

Die nachfolgende Abb. 41 verdeutlicht die hochkomplexe Interaktion des Sarcoglykan-Komplexes an der zellulären Membran von dem die Isoform β -SG einen Teil darstellt.

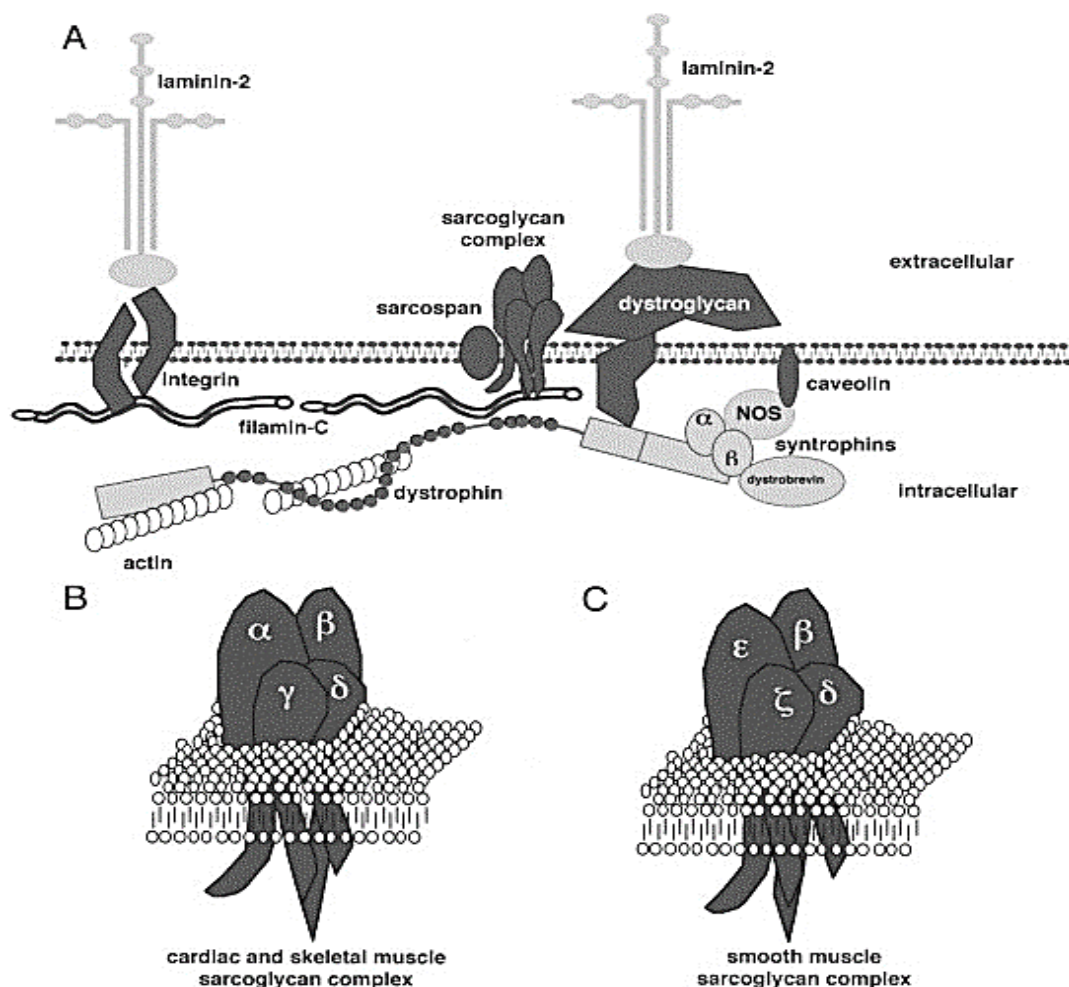


Abb. 41: Schematische Darstellung des Dystrophin- Glykoprotein Komplexes (DGC) und der Sarcoglykan-Subkomplex-Typen. (A) Der Sarcoglykan- Komplex interagiert mit Dystroglykan an der extrazellulären Matrix und mit Filamin 2 und Dystrophin auf der intrazellulären Seite. (B) Der Sarcoglykan- Komplex in den Skelett- und Herzmuskelzellen besteht aus den Untereinheiten α -, β -, δ - und γ - Sarcoglykan. (C) Der Sarcoglykan- Komplex in der glatten Muskulatur besteht aus den Untereinheiten ζ -, ϵ -, δ - und β - Sarcoglykan (Wheeler und McNally 2003).

NOS (Stickstoffmonoxid- Synthase)

In den epithelialen Drüsenstrukturen des Endometriums und in den endometriotischen Entitäten ist das Protein β -SG als ein Teil des Sarcoglykan- Komplexes, der wiederum zum Dystrophin- Glykoprotein- Komplex gehört, bis dato in keinen Forschungsarbeiten beschrieben worden.

Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass das Protein β -SG in den epithelialen Drüsenstrukturen des Endometriums und in den endometriotischen Läsionen des Ovars, Peritoneums und der tief infiltrierenden Endometriose immunhistochemisch nachweisbar ist.

Welche mögliche Bedeutung könnte das Protein β - Sarcoglykan für das Endometrium und die Endometriose haben? Für eine mögliche Hypothese sollte man zuerst prüfen, in welchen epithelialen Drüsenstrukturen β - Sarcoglykan außer im Endometrium noch lokalisiert ist. Die einzigen epithelialen Drüsen, in denen β - Sarcoglykan bis dato nachgewiesen wurde, sind im Brust- und Prostatagewebe lokalisiert (Arco et al. 2012, Cutroneo et al. 2014). Dies lässt möglicherweise eine Präferenz der Expression von β - Sarcoglykan in den geschlechtsspezifischen Organen vermuten. Da β - Sarcoglykan als Untereinheit des Sarcoglykan- Komplexes in den epithelialen Drüsen des Endometriums vorzufinden ist, deutet es durchaus an, dass die Zellen zur Stabilität und damit zur Lebensfähigkeit auf diesen Protein- Komplex angewiesen sind, um einige ihrer Funktionen intra- und extrazellulär zu erfüllen. Zusätzlich werden die Sarcoglykane mit benignen und malignen Tumoren in Verbindung gebracht (Arco et al. 2012, Cutroneo et al. 2014). Diese Informationen könnten auch eine wahrscheinliche Rolle des β - Sarcoglykans in Verbindung mit der Endometriose vermuten lassen, da sehr wohl bekannt ist, dass die Endometriose auch Eigenschaften mit einem zerstörenden, invasiven und metastasierenden Potenzial besitzt (Teng et al. 2016). In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass Sarcoglykane Abschnitte von Cadherin- Domänen enthalten (Dickens et al. 2002). Diesen Cadherin- Proteinen wird eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung zugeschrieben (Juan et al. 2016). Weitere Funktionen der Cadherine sind die Zelladhäsion durch Interaktion mit anderen Molekülen und die Reaktion auf verschiedene extrazelluläre Signale mit Kontrolle von Sortierung, Organisation und Migration der Zelle. An der Zelloberfläche werden Cadherine durch einen innenliegenden Signalmechanismus reguliert (Gumbiner 2005). Darüber hinaus ähneln sich Sarcoglykane und Cadherine auch in ihren zellulären Lokalisationen, Funktionen und posttranskriptionellen Modifikationen (Dickens et al. 2002). Diese Proteine können möglicherweise zur

Entstehung von metastasierenden Prozessen beitragen. Die Cadherine könnten die Tumorzellen begünstigen, aus dem epithelialen Zellverband zu entweichen und ihnen so die Möglichkeit geben, zu metastasieren (Nguyen et al. 2011).

Auf Grundlage der o.g. Erkenntnisse könnte β -Sarcoglykan an ähnlichen molekularen Mechanismen in den epithelialen Drüsen des Endometriums beteiligt sein. Es könnte infolgedessen bei den endometrialen Zellen die Migration und Implantation begünstigen. Diese Faktoren auf der zellulären Ebene können einen möglichen Ansatz bieten, auf dessen Grundlage man beispielsweise funktionelle Arrays zur Zellmigration ausführen kann, um diese Vermutungen in den eutopen endometrischen Drüsen und ektopen endometriotischen Läsionen zu klären.

5.2.2 Analyse von Enpp2

In den ersten Publikationen wurde Enpp2 als ein stimulierender Tumor- Motilitätsfaktor beschrieben (Stracke et al. 1992). Für das Protein Enpp2 ist auch das Synonym Autotaxin bekannt. Enpp2 ist ein sezerniertes Protein und ist in vielen biologischen Flüssigkeiten, einschließlich dem Blut, vorhanden (Sevastou et al. 2013).

Ebenfalls ist beschrieben, dass Enpp2 die Funktion einer Lysophospholipase hat, welche Lysophosphatidylcholin (LPC) in den Lipidmediator Lysophosphatidsäure (LPA) umwandelt (van Meeteren und Moolenaar 2007). Die Enpp2- LPA- Achse wird auch mit der neuronalen Entwicklung, Tumorprogression, Metastasierung und neuropathischen Schmerzen in Verbindung gebracht (Hausmann et al. 2011).

Außerdem fördert es die Angiogenese und ist notwendig für die Embryonalentwicklung (van Meeteren et al. 2006).

Enpp2 ist auch ein wichtiger Akteur in der Pathogenese der Arthritis und Lungenfibrose. Außerdem gibt es verschiedene Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an anderen chronischen Entzündungskrankheiten, welche auf die Stimulierung der lokalen Lysophosphatidsäure Produktion zurückzuführen ist (Sevastou et al. 2013).

Ebenso wird durch Enpp2 die Wundheilung gefördert (van Meeteren et al. 2006).

Bisherige Untersuchungen mit Enpp2 wurden nur an Uteri von Schweinen und Ratten vorgenommen. Es konnte festgestellt werden, dass Enpp2 in der Gebärmutter Schleimhaut überwiegend an luminalen Drüsenepithelzellen exprimiert und in das Lumen des Uterus bei Schweinen sezerniert wird (Seo et al. 2012, 2013).

Es konnte auch gezeigt werden, dass Enpp2 in Rattenuteri mit unterschiedlicher Konzentration und Expression während der jeweiligen Brunstzyklen vorzufinden ist. Im Verlauf des Proöstrus („Vorbrunst“) und Östrus konnte Enpp2 eher in den stromalen Zellen detektiert werden. Beim Diöstrus fand sich wiederum eine erhöhte Lokalisation in den Epithelzellen des Endometriums (Ahn et al. 2011). Außer in den tierischen Reproduktionsorganen konnte Enpp2 ebenfalls im Genitaltrakt von Frauen beispielsweise an Plazentagewebe in den Trophoblasten immunhistochemisch detektiert werden (Iwasawa et al. 2009).

Unsere Untersuchungen beschreiben als erste immunhistochemisch das Verteilungsmuster von Enpp2 speziell in den humanen Drüsenstrukturen des Endometriums, sowie in der Endometriose des Ovars, Peritoneums und der DIE.

Welche mögliche Bedeutung könnte das Protein Enpp2 im Endometrium haben?

Es ist bekannt, dass das Produkt von Enpp2, die LPA, an vielen Zellfunktionen wie z.B. der Proliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Invasion beteiligt ist. Diese Funktionen beeinflussen viele biologische Prozesse, insbesondere jedoch die Angiogenese (Ishii et al. 2004). Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden, dass die Enpp2- LPA- Achse in den Trophoblasten der Plazenta eine regulatorische Funktion für die Neugestaltung der Gefäße haben könnte (Iwasawa et al. 2009).

In diesem Zusammenhang könnte die Enpp2- LPA- Achse möglicherweise eine unterstützende Funktion im Endometrium bei der Gefäßentwicklung haben, da das Endometrium nach jedem Menstruationszyklus ein neues Gefäßsystem durch Angiogenese und vaskuläre Neugestaltung aufbaut und so zelluläres Wachstum und die Differenzierung unterstützt (Okada et al. 2014).

Ferner lassen Untersuchungen im Rattenuterus vermuten, dass Enpp2 die Proliferation der Uteruszellen reguliert und LPA als Mediator der epithelialen Zellen untereinander und mit den Stromazellen fungieren könnte (Ahn et al. 2011). Ähnliche regulatorische Funktionen wären auch im humanen Endometrium durchaus als eine mögliche Option in Erwägung zu ziehen.

Welche mögliche Bedeutung könnte das Protein Enpp2 in der Endometriose haben?

Obwohl die Entstehung der Endometriose nicht vollständig verstanden ist, deuten mehrere Indizien darauf hin, dass entzündliche Prozesse eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Endometriose spielen könnten und dass eine veränderte inflammatorische Umgebung beispielsweise in der Peritonealhöhle, das Überleben und das Wachstum endometriotischer Zellen unterstützt (Yamada-Nomoto et al. 2016). Es

könnten mögliche Zusammenhänge von Enpp2 mit diesen inflammatorischen Prozessen bestehen. Es konnte in den vaskulären Endothelzellen gezeigt werden, dass das Substrat (LPC) von Enpp2 das Enzym Cyclooxygenase 2 (COX-2), welches einen wichtigen pro- inflammatorischen Mediator darstellt, induziert. Es wird somit vermutet, dass LPC die Fähigkeit von immunregulatorischen Zellen beeinflusst, inflammatorische Prozesse und Immunantworten zu modulieren (Sevastou et al. 2013). Ebenso konnte das LPA als ein Wachstumsfaktor, der Zellen positiv beeinflusst, bestimmt werden. LPA aktiviert und stimuliert eine Reihe von intrazellulären Entzündungsprozessen und Mediatoren (Sevastou et al. 2013). Es konnte auch das Enzym Enpp2 selbst in den synovialen Fibroblasten von proinflammatorischen Faktoren wie z.B. TNF (Tumornekrosefaktor) induziert werden. Außerdem wird die Enpp2- LPA- Achse mit der Pathogenese von Arthritis (Nikitopoulou et al. 2012) und Lungenfibrose in Verbindung gebracht (Sevastou et al. 2013). In einer weiteren wichtigen inflammatorischen Erkrankung, dem Asthma bronchiale, konnte eine erhöhte Expression von Enpp2 in den Atemwegen der Patienten nachgewiesen werden (Park et al. 2013). Das Substrat LPC, das Produkt LPA und das Enzym Enpp2 zeigen einen Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen im Körper und geben mehrere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung an chronischen entzündlichen Erkrankungen. Durch den Nachweis von Enpp2 in den endometriotischen Läsionen ist es durchaus denkbar, dass auch in der teilweise chronisch inflammatorischen verlaufenden Endometriose Enpp2 die möglichen o.g. Funktionen übernimmt und somit einen Progress fördert.

Es sind noch zwei weitere plausible Faktoren zu erwähnen, welche in einem Zusammenhang mit der Endometriose stehen könnten. Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von Enpp2 in den lymphatischen hochendothelialen Venolen nachweisbar ist. Es wird folglich durch die Sekretion von Enpp2 der Eintritt von beispielsweise Lymphozyten in das lymphatische System gefördert (Houben und Moolenaar 2011).

Des Weiteren wird Enpp2 auch bei malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Es konnte eine erhöhte Expression von Enpp2 gefunden werden, welche mit einer erhöhten Invasivität von Brustkrebszellen korreliert (Yang et al. 2002). Außerdem sind in weiteren Karzinomen wie in der Leber, Schilddrüse und Lunge erhöhte Konzentrationen von Enpp2 nachweisbar (David et al. 2010). Ebenfalls verstärkt Enpp2 das metastatische und invasive Potenzial von ras- transformierten Zellen (Nam et al. 2000).

Das Protein Enpp2 könnte so möglicherweise zu Migrationsprozessen in der Endometriose beitragen. Die eutopen endometrialen Drüsen könnten durch die Funktion von Enpp2 beispielsweise auch einen Weg über das lymphatische System finden und sich an einen anderen Ort implantieren. Es konnten schon mehrere Studien endometriotische Zellen in Lymphknoten nachweisen (Mechsner et al. 2010). Durch die bekannte erhöhte Invasivität der endometriotischen Läsionen könnte Enpp2 ebenfalls eine mögliche Metastasierung fördern. Auch hier wären weitere Untersuchungen angebracht, um die neuen Erkenntnisse in Zusammenhang mit Enpp2 im Endometrium und der Endometriose zu analysieren.

5.2.3 Analyse von Pck2

Das Protein Pck2 ist auch unter dem Synonym PEPCK- M (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial) bekannt. Das Protein Pck2 wird in verschiedenen Organen exprimiert, jedoch überwiegend in der Leber und Niere (Modaressi et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass Pck2 beim physiologischen Energiestoffwechsel der Glukoneogenese eine Rolle spielt (Stark et al. 2014). Auch in anderen Organen wie im Pankreas ist Pck2 in den β - Zellen exprimiert, wo es bei Prozessen am Citrat-Zyklus mitwirkt und diesen aufrechterhält (Stark et al. 2009). Außerdem ist Pck2 auch in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes vorhanden, wo es vermutlich dazu beiträgt, die Aktivität des Citrat- Zyklus zu regulieren und auf intramitochondrialer Ebene die Phosphorylierung mit zytoplasmatischen und energiebedürftigen Prozessen zu verknüpfen (Drahota et al. 1983). Das Enzym spielt wahrscheinlich unter anderem eine Rolle bei der Pathogenese des Diabetes Mellitus (Stark und Kibbey 2014). Neuen Studien zufolge ist Pck2 auch in Lungenkrebszellen aktiv. In diesen Tumorzellen war die Pck2 Expression und Aktivität unter niedrigen Glucosebedingungen erhöht vorgefunden worden, ebenso war die Aktivität um das Dreifache höher als im Vergleich zu normalen Lungengewebsproben (Leithner et al. 2015). Auch in Karzinomzelllinien der weiblichen Brust, des Gebärmutterhalses und des Dickdarms konnte eine selektive Expression von Pck2 registriert werden, sodass die Pck2- Aktivität bestimmte Funktionen bei Tumorstoffwechselanpassungen unterstützen (Méndez-Lucas et al. 2014).

In einer weiteren Publikation, in der die Dezidualisierung des Endometriums

beschrieben wurde, konnte eine Herunterregulierung des Pck2 in den endometrialen Stromazellen des Uterus nachgewiesen werden (Bombail et al. 2010).

Unsere immunhistochemische Arbeit leistet einen Beitrag zur Lokalisation/Klassifikation und damit zur Charakterisierung des Proteins Pck2 in den humanen Drüsenstrukturen des Endometriums und in den endometriotischen Entitäten Ovar, Peritoneum und DIE.

Was für eine mögliche Bedeutung könnte Pck2 im Endometrium und in der Endometriose haben? Es ist bekannt, dass Pck2 es den Zellen ermöglicht, aus der Aminosäure Glutamin das Stoffwechselzwischenprodukt Phosphoenolpyruvat (PEP) zu produzieren, das verwendet wird, falls die Glucose- Speicher erniedrigt sind (Vincent et al. 2015). Ebenso katalysiert das Enzym Pck2 im Energiestoffwechsel die Umwandlung von Oxalacetat zu PEP (Balsa-Martinez und Puigserver 2015). Da das Enzym Pck2 in den eutopen endometrialen Drüsenstrukturen nachweisbar ist, spricht dies durchaus dafür, dass Pck2 ebenso im Endometrium eine katalytische Funktion übernehmen könnte und eine mögliche Beteiligung am Energiestoffwechsel hätte, wie beispielsweise in den Leberzellen.

Interessanterweise konnte eine erhöhte Pck2- Expression in verschiedenen Tumorzellen wie der Schilddrüse, Blase, Brust, Niere und des nicht- kleinzelligen Lungenkrebs nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die erhöhte Pck2- Expression in den Tumorzellen für die Zellproliferation und die Tumorprogression erforderlich ist (Vincent et al. 2015). In diesem Zusammenhang wird den Tumorzellen durch das Enzym Pck2 ein möglicher Überlebensvorteil zugeschrieben; da Pck2 es den Tumorzellen ermöglicht, sich an niedrige Glukosekonzentrationen in der Umgebung anzupassen (Méndez-Lucas et al. 2014). Balsa-Martinez und Puigserver (2015) gehen weiter und vermuten, dass bestimmte Tumorzellen das Enzym Pck2 dafür verwenden, um die Glykolyse umzukehren und Lipide sowie Nukleinsäuren aus Nicht-Kohlenhydratquellen wie Glutamin zu synthetisieren. Dieser selektive Wachstumsvorteil der Tumorzellen in einer nährstoffarmen Umgebung mit Hilfe von Pck2 könnte auch eine mögliche Verbindung mit der Endometriose haben. Da das Enzym Pck2 in den endometriotischen Läsionen ebenfalls exprimiert wird, könnte man annehmen, dass Pck2 in diesen Läsionen ähnliche Funktionen wie in den Tumorzellen übernehmen und somit die Progression und die Proliferation der Endometriose fördern könnte. Außerdem würde es daher möglicherweise auch erklären, weshalb die endometriotischen Zellen so eine besondere Fähigkeit haben und sich an bestimmten

nährstoffarmen Umgebungen wie beispielsweise im Peritoneum ansiedeln können. Der Nachweis der Lokalisation von Pck2 im Endometrium und der Endometriose könnte noch sehr nützlich sein, denn die Erkenntnisse bieten einen möglichen neuen Ansatz, auf dessen Grundlage quantitative Untersuchungen durchgeführt werden können, ähnlich wie beispielsweise die Stärke der Expression von Pck2 in den Tumorzellen bestimmt wurde.

5.4 Diskussion der Ergebnisse im Endometrium und der Endometriose

Die Endometriose gehört zu den häufigsten benignen gynäkologischen Erkrankungen mit einer sehr hohen Rezidivneigung (Schweppe 2003, Hornung et al. 2004). Die vollständige Pathogenese dieser vermutlich östrogenabhängigen Krankheit ist nach wie vor nicht verstanden (Georgiou et al. 1999, Gurates und Bulun 2003). Die gutartig proliferierende Endometriose weist Eigenschaften der Invasivität, Zerstörung und Metastasierung auf, wie sie für maligne Erkrankungen typisch sind, ohne jedoch wie maligne Tumoren zu entarten (Teng et al. 2016). Die Endometriose stellt ein klinisches und ökonomisches Problem für die Bevölkerung dar, welches immer noch deutlich unterschätzt wird (Oppelt et al. 2012).

Im Gegensatz zum immunhistochemischen Goldstandard- Marker CD10, der für das Stroma des eutopen endometrialen Gewebe und ektopen endometriotischen Gewebe (Sumathi und McCluggage 2002) verwendet wird, sind für die epithelialen Drüsenstrukturen in eutopen endometrialen und ektopen endometriotischen Gewebe noch keine epithelialen Gewebemarkers etabliert (Gronbach 2016).

Um die Gewebe- Charakterisierung der Endometriose besser zu erforschen und ein Gesamtverständnis zu bekommen, hat sich diese experimentelle Studie diesem Thema gewidmet. Der Schwerpunkt der Arbeit bestand darin, mit Hilfe von epithelialen Markern, die bislang im Endometrium nur wenig beschrieben waren, die Drüsenstrukturen im Endometrium mit den endometriotischen Entitäten DIE, Peritoneum und Ovar auf Übereinstimmungen und Unterscheidungen zu analysieren. Die Haupthypothese beschäftigte sich damit, ob diese gewebspezifischen Marker in endometrialen Drüsen wie auch in den anderen endometriotischen Entitäten ein einheitliches Expressionsmuster aufzeigen, oder ob sie sich grundlegend voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die drei Proteine β -SG, Enpp2 und Pck2 bei den gesunden

Probandinnen (ohne Endometriose) alle nahezu vollständig in den Drüsen des Endometriums vorzufinden sind. Die drei Marker sind mit großer Mehrheit im Zytoplasma der epithelialen Drüsenstrukturen des Endometriums nachweisbar. Überraschenderweise sind die drei Proteine auch in der tief infiltrierenden Endometriose mit einer fast identischen Lokalisation und sehr hohen Häufigkeit vorzufinden. Im Gegensatz dazu wurde postuliert, dass es sich bei der tief infiltrierenden Endometriose um eine separate Entität mit einer eigenen Pathogenese handelt (Nisolle und Donnez 1997). Demzufolge sind die Drüsen- und Stromastrukturen, welche außerhalb des Endometriums vorzufinden sind, in ihrem histologischen Erscheinungsbild verschieden (Nisolle und Donnez 1997).

Unsere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die eutopen Drüsen des Endometriums und die tief infiltrierende Endometriose ein weitestgehend übereinstimmendes histologisches Expressionsmuster für die drei Marker aufweisen. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, die Sampson schon im ersten Drittel des letzten Jahrhunderts aufgestellt hat. Er formulierte mit seiner Hypothese, dass die eutopen endometrischen Drüsen retrograd während der Menstruation durch die Tuben in die Bauchhöhle wandern und sich dort implantieren können (Sampson 1927b). Demnach sollten Endometrium und Endometriose stark im Proteinprofil übereinstimmen.

Analysen in der Vergangenheit mit anderen Proteinen zeigten ähnliche Ergebnisse; so konnten immunhistochemische Untersuchungen bei der Verteilung von Kollagen Typ I, III und IV in ektopen endometrialen Läsionen und im intrauterinen Endometrium von Patienten mit oder ohne Endometriose detektiert werden. Das Kollagen vom Typ I war das vorherrschende Kollagen, welches in dem umgebenden Kollagengewebe mit der tief infiltrierenden Endometriose assoziiert war (Stovall et al. 1992).

Ebenfalls zeigte eine andere Studie, dass sich die Expression der Zytokeratin- Moleküle im eutopischen Endometrium und in der ektopischen endometriotischen Läsionen nicht unterscheiden (Kruitwagen et al. 1991). Eine weitere Untersuchung konnte die Expression vom Transmembranprotein Mucin- 1 in eutopischen Endometrium und in den ektopischen endometriotischen Läsionen nachweisen (Dharmaraj et al. 2014). Es konnte ebenso in der Arbeit von Gronbach (2016) Mucin-1, Zytokeratin 18 und 19 bei fast allen Drüsen und Epithelzellen im Endometrium und in der Endometriose immunhistochemisch lokalisiert werden.

Dies sind einige schlüssige Argumente, welche für eine hohe Übereinstimmung der beiden Entitäten, der tief infiltrierenden Endometriose und der Drüsen des eutopen

Endometriums sprechen, sodass man von der Annahme einer Implantation des endometrialen Ursprungsgewebes ausgehen kann.

Für die andere endometriotische Entität, das Peritoneum, konnte eine gute Ausprägung (84,1%) der Proteinexpression für β -SG, Enpp2 und Pck2 nachgewiesen werden. Die Expression war in ihrer Übereinstimmung nicht so hoch, wie das eutope Endometrium verglichen mit der tief infiltrierenden Endometriose (95,7%), jedoch stärker ausgeprägt als eutopes Endometrium im Vergleich mit der ovariellen Endometriose (68,7%).

Worin könnte die leichte Abweichung der Proteinexpression in der peritonealen Endometriose liegen? Es gibt in der peritonealen Endometriose Einflussfaktoren der Umgebung. Zu denen zählt beispielsweise das Milieu in der peritonealen Flüssigkeit, welche eine spezifische Regulation aufweist und so Wachstum und Progression durch Zytokine, und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Koninckx et al. 1999). Auch eine andere Studie in den Jahren zuvor konnte zeigen, dass die Wachstumsfaktoren in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen in höheren Konzentrationen nachweisbar waren (Oral et al. 1996). Ebenfalls konnte in aktuelleren Studien eine erhöhte Konzentration von proinflammatorischen Faktoren wie z.B. Interleukin- 6 in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen gemessen werden (Velasco et al. 2010). Zusätzlich unterscheiden sich in der Peritonealflüssigkeit die endokrinen Konzentrationen von denen im Blutkreislauf. Es kann somit vermutet werden, dass die peritoneale Endometriose durch die Faktoren der Peritonealflüssigkeit beeinflusst wird (Koninckx et al. 1999). Diese Differenzen der peritonealen Umgebung bei der Peritonealendometriose könnten schon einen minimalen Einfluss auf die Proteinexpression in den oberflächlichen Läsionen bewirken. Die o.g. Einflussfaktoren wären eine mögliche Begründung, weshalb die Proteinexpression in unserer Untersuchung für peritoneale Endometriose keine vollständige Übereinstimmung mit den eutopen endometrialen Drüsen aufweist.

In unseren Untersuchungen zeigt sich eine Ausnahme für die letzte zu erwähnende Entität, der ovariellen Endometriose, für die drei Marker β -SG, Enpp2 und Pck2. In dieser Entität fällt eine schwächere Proteinexpression (68,7%) auf als in den eutopen endometrialen Drüsenstrukturen. Wie kann man sich diese Resultate in der ovariellen Endometriose am ehesten erklären? Wie bei der peritonealen Endometriose gibt es in der ovariellen Endometriose ebenfalls Einflussfaktoren der Umgebung. Eine mögliche Erklärung kann im Unterschied der Hormonwirkungen auf die Eierstockumgebung liegen (Kamergorodsky et al. 2009). Es ist beispielsweise festgestellt worden, dass es

niedrigere Testosteronspiegel im Serum von Patienten mit ovarieller Endometriose gibt (Ono et al. 2014). Im Gegensatz dazu fanden Huhtinen et al. (2014) keine Unterschiede im Serum, dafür aber deutlich erhöhte Testosteronspiegel im Gewebe der ovariellen Endometriose. Ein weiteres Hormon, welches im Ovar eine erhöhte Expression bei ovariellen Endometriosepatientinnen aufwies, ist das Anti-Müller-Hormon (Carrarelli et al. 2014). Außerdem ist bekannt, dass die intra- ovariellen Konzentrationen in der ovariellen Endometriose sich vom Plasma oder der Peritonealflüssigkeit unterscheiden (Koninckx et al. 1999, Huhtinen et al. 2012, 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesunden Patientinnen eine unterschiedliche Lipidexpression (Sphingolipid und Phosphatidylcholin) in der ovariellen Endometriose vorzufinden ist (Cordeiro et al. 2015).

Das sind einige Faktoren, die sich vermutlich auch in unseren Ergebnissen widerspiegeln, weshalb die ovarielle Endometriose verglichen mit dem eutopischen Endometrium keine sehr gute Übereinstimmung aufweist.

Es kann eventuell auch ein ganz anderer Einfluss im Zusammenhang mit der ovariellen Endometriose diskutiert werden. Neuerdings wird die Endosalpingiose genauer von der Endometriose abgegrenzt. Die Endosalpingiose ist durch die Anwesenheit von zystischen Drüsenstrukturen gekennzeichnet, die von gutartigem Tubenepithel ausgehen (Bristol-Gould et al. 2005). Es besteht bei der Endosalpingiose ebenfalls, wie bei der Endometriose, eine symptomatische Gemeinsamkeit in Form von chronischen Unterleibbeschwerden (Keltz et al. 1995).

Eine weitere Gemeinsamkeit ist, dass sich die Endosalpingiose von der Endometriose in ihrem makroskopischen Erscheinungsbild kaum unterscheidet, mit ähnlich gelb-weißlich punktierten zystischen Läsionen (Prentice et al. 2012). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass die Endosalpingiose eine häufig unterdiagnostizierte oder falsch diagnostizierte Entität bei Frauen ist, welche zuvor häufig als eine Endometriose bestimmt wurde (DeHoop et al. 1997). Zusätzlich gibt es einen gewissen Verwandtschaftsgrad zwischen Tubengewebe und Endometriumgewebe, da Tubengewebe in der Lage ist, Endometrium- ähnliches Gewebe zu bilden, welches z.B. nach einer Tubenligatur beobachtet werden konnte (Yuan et al. 2014). Dies macht es dementsprechend für Histopathologen schwerer, beispielsweise die zystische Endosalpingiose richtig zu diagnostizieren (McCluggage 2000). Es könnte also durchaus möglich sein, dass es zu Verwechslungen zwischen den beiden Erkrankungen kommen kann, bedingt durch ihre Überschneidungen.

Eine andere Betrachtungsweise, welche man nicht außer Acht lassen sollte, ist dass vor kurzer Zeit eine Studie (Yuan et al. 2014) die Pathogenese der ovariellen Endometriose in ein anderes Licht rückte. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein großer Teil ihrer Endometrioseproben als Ursprungsgewebe aus dem Eileiter abgeleitet sein könnten, während ein kleiner Teil ihrer Endometrioseproben endometrialen Ursprungs sein könnten (Yuan et al. 2014). Dies kann eventuell erklären, weshalb in unseren immunhistochemischen Analysen die drei Marker β -SG, Enpp2 und Pck2 in der ovariellen Endometriose keine vollständige Expression aufweisen, da möglicherweise auch in unseren analysierten endometriotischen Gewebeproben eine gewisse Zahl an Proteinsignaturen aus den Eiteiterepithelien stammen könnte. Weitere immunhistochemische Untersuchungen in diesem Zusammenhang könnten darauf eine Antwort geben.

Die Schlussfolgerung, die man aus unseren Untersuchungen für die Zukunft ziehen kann, ist, dass wir zeigen konnten, dass in den eutopen endometrischen Drüsen und in den ektopen endometriotischen Läsionen eine große Übereinstimmung der Proteinexpression nachweisbar ist. Die geringe bzw. mittlere Abweichung in den Entitäten, PE und Ovar, sind vermutlich auf die o.g. verschiedenen Einflussfaktoren der Umgebung zurückzuführen. Unterstützt wird unsere Hypothese durch die Hypothese von Koninckx et al. (1999), welche einen Einfluss von Faktoren im Blutstrom auf das Endometrium sehen, sowie die Regulation der oberflächlichen Peritonealendometriose durch peritoneale Flüssigkeitsfaktoren und der ovariellen Endometriose durch intra-ovarielle Konzentrationen, die sich von Plasma oder Peritonealflüssigkeit unterscheiden. Ebenso in der Vergangenheit konnten immunhistochemische Untersuchungen mit Keratinen zeigen, dass die ektopischen endometriotischen Läsionen und eutopischen endometrialen Drüsen die gleiche Proteinexpression aufwiesen (Kruitwagen et al. 1991).

Auch wenn ältere Studien die These formulieren, dass es sich bei den drei Entitäten (DIE, PE und Ovar) der Endometriose um eine jeweils eigenständige Pathogenese handelt (Nisolle und Donnez 1997) und andere Untersuchungen einen vermutlichen Unterschied zwischen endometriotischen Zellen und eutopischen Endometriumzellen vorzeigen konnten (Koninckx et al. 1999); haben wir in unseren histologischen Analysen eine große Ähnlichkeit in Struktur und Aufbau von eutopen endometrialen Drüsen und ektopischen endometriotischen Läsionen vorfinden können. Diese

Beobachtungen werden von anderen Analysen ebenfalls unterstützt, die den endometrialen Drüsen und den ektopen endometriotischen Läsionen in ihrer histologischen Struktur und ihrem Aussehen Vergleichbarkeit zuschreiben (Clement 2007). Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher erwähnt werden sollte, ist, dass in ovariellen Endometriosezysten ein monoklonaler Ursprung der epithelialen Zellen nachgewiesen werden konnte (Jimbo et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse konnte später auch für die oberflächlichen peritonealen endometriotischen Läsionen gezeigt werden (Nabeshima et al. 2003).

Die monoklonale Nachweise der endometriotischen Läsionen und auch unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass die Endometriose höchstwahrscheinlich von einer Ursprungsentität abstammt, welche Sampsons Implantationstheorie bestätigen würde (Sampson 1927b). Ebenso erhärten klinische Untersuchungen die Implantation der eutopen endometrialen Drüsen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patientinnen mit Fehlbildungen des Genitaltraktes und einer gestörten Menstruation durch die Vagina ein erhöhtes Risiko für Endometriose haben (Olive und Henderson 1987). Auch mehrere epidemiologische Studien berichteten, dass kürzere Menstruationszyklen, längere Durchflusszeiten und stärkere Menstruationsblutungen Risikofaktoren für die Endometriose sind (Eskenazi und Warner 1997), so dass im Umkehrschluss Frauen mit mehreren Schwangerschaften ein verringertes Risiko einer Endometriose haben, vermutlich aufgrund der verringerten Anzahl an Monaten mit Menstruationsfluss (McLeod und Retzliff 2010). Auch eine operative Tubenligatur reduziert den retrograden Blutfluss deutlich (Vercellini et al. 2011).

Insgesamt kann man sagen, dass zum grundlegenden Verständnis der Endometriose immer noch die Implantation von Endometriumzellen außerhalb der Gebärmutterhöhle an anderweitige Orte gehört (Machairiotis et al. 2013). Die unterschiedlichen lokalen Einflüsse in den jeweiligen Entitäten müssen in diesen Zusammenhang ebenfalls berücksichtigt werden.

5.5 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse leisten einen Beitrag für das bisher noch immer ungeklärte Verständnis der Klassifikation und damit möglicherweise zur Entstehung der Endometriose im weiblichen Körper. Auf Grundlage dieser Arbeit können sich weitere Untersuchungen anschließen, um die Pathogenese der Endometriose noch exakter zu erforschen. Es wäre wünschenswert mit den drei Markern Beta- SG, Enpp2 und Pck2 ein noch größeres Patientenkollektiv zu untersuchen, um eine größere quantitative Aussagekraft zu erhalten. Außerdem wäre es von weiterem Interesse die jeweiligen Umgebungen der endometriotischen Entitäten noch genauer zu erforschen, um einen Informationsgewinn für die entscheidenden multifaktoriellen Einflussfaktoren zu erhalten. Für diese Erkenntnisse würden sich beispielsweise Untersuchungen an Tiermodellen ebenfalls gut eignen.

Auf eine qualitative Verbesserung der Methoden sollte ebenso geachtet werden, um allgemeine Fehlerquellen der Immunhistochemie wie z.B. die verzögerte Fixierung von Geweben, die unzureichende Länge der Fixierung, eine schlechte Penetration des Fixiermittels und eine Überfixierung für einen möglichen Verlust der Antigenität zu vermeiden (Marsch et al. 2015). Ebenso ist ein schnellstmöglicher Transfer der entnommenen Gewebeproben ins Labor sehr wichtig.

Es bleibt abzuwarten, welche neuen Erkenntnisse auf Basis unserer Arbeit in den nächsten Jahren gesammelt werden und welche Konsequenzen sich daraus für das Gesamtverständnis der Endometriose ergeben.

6. Zusammenfassung

Die ätiologischen Mechanismen der Endometriose werden nach wie vor diskutiert, trotzdem werden die peritoneale, ovarielle und tief infiltrierende Endometriose als unterschiedliche Entitäten der Endometriose angesehen. Um den Verwandtschaftsgrad zwischen dem eutopen Endometrium und den drei endometriotischen Entitäten zu analysieren, wurde eine immunhistochemische Untersuchung zur Identifizierung der Proteinexpression durchgeführt. Nach Abschluss der Studie wurden 102 Gesamtproben von n= 90 Patientinnen analysiert; davon 23 Uteri ohne Endometriose; 10 Adenomyosen; 30 peritoneale Endometrioseherde; 20 tief infiltrierende Endometrioseherde und 19 ovarielle Endometrioseherde. Die Proben wurden von der operativen Sektion unserer gynäkologischen Abteilung zur Verfügung gestellt.

Es wurde zu Beginn der Studie mit sieben gewebspezifischen Proteinen gearbeitet (Pace4, Gsk3 β , CD9, WDR13, β -SG, Enpp2 und Pck2). Für drei von den sieben Proteinen (β -SG, Enpp2 und Pck2) konnte eine Expression von 99,3% in nahezu allen endometrialen Drüsen und Epithelien nachgewiesen werden. Die drei Proteine, ein membranassoziiertes (β - Sarcoglykan), ein sezerniertes (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2) und ein mitochondriales (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) Enzym wurden anschließend für die Analyse in den endometriotischen Entitäten (DIE, PE und Ovar) verwendet.

In der tief infiltrierenden Endometriose konnte die Proteinexpression für β - Sarcoglykan mit 99,6%, für Enpp2 mit 88,9% und für Pck2 mit 98,5% nachgewiesen werden.

Die Proteinexpression für die drei Marker in der peritonealen Endometriose war für β - Sarcoglykan 89%, für Enpp2 77,7% und für Pck2 85%. In der dritten endometriotischen Entität, dem Ovar, zeigte sich eine Proteinexpression für β - Sarcoglykan mit 84,4%, für Enpp2 mit 56% und für Pck2 mit 62,4%.

Zusammengenommen zeigen unsere Ergebnisse, dass das Proteinexpressionsmuster der tief infiltrierenden Endometriose (95,7%) nahezu identisch mit dem Endometrium (99,3%) ist. Das Protein- Expressionsprofil der peritonealen Endometriose zeigt ebenfalls eine große Übereinstimmung (84,1%) mit dem Endometrium (99,3%), während die Expression der Proteine in der ovariellen Endometriose eine schwächere Übereinstimmung (68,7%) mit dem eutopen endometrialen Drüsen aufzeigen.

Auf Basis der Ergebnisse im Endometrium und der Endometriose ist ein hoher Grad an Übereinstimmung im Proteinexpressionsmuster der epithelialen Drüsen und Läsionen

nachweisbar, welches einen gemeinsamen Ursprung der Endometriose aus dem Endometrium vermuten lässt.

Abstract

The etiological mechanisms of endometriosis are still being discussed, however, peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis are viewed as distinct entities of endometriosis. In order to analyze the degree of similarity between the eutopic endometrium and the three endometriotic entities, we performed an immunohistochemical study to quantify protein expression. At the end of the study, 102 total samples of n= 90 patients were analyzed; of which 23 uteri without endometriosis; 10 adenomyosis; 30 peritoneal endometriotic foci; 20 deep infiltrating endometriotic foci and 19 ovarian endometriotic foci. The samples were made available by the operative section of our gynecological department (Justus-Liebig-University Giessen). At the beginning of the study, seven tissue-specific proteins were used (Pace4, Gsk3 β , CD9, WDR13, β -SG, Enpp2 and Pck2). Three of the seven proteins (β -SG, Enpp2 and Pck2) showed expression in almost all endometrial glands and epithelia with a positivity of 99.3%. The three proteins, one membrane-associated (β - sarcoglycan), one secreted (ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 2) and one mitochondrial (phosphoenolpyruvate carboxykinase 2) enzyme were subsequently used for analysis of the endometriotic entities (DIE, PE and Ovar). In the deep infiltrating endometriosis, the protein expression for β - sarcoglycan could be detected with 99.6%, for Enpp2 with 88.9% and for Pck2 with 98.5%. Protein expression for all three markers in peritoneal endometriosis was 89% for β - sarcoglycan, 77.7% for Enpp2 and 85% for Pck2. In the third endometriotic entity, the ovary, a protein expression for β - sarcoglycan with 84.4%, for Enpp2 with 56% and for Pck2 with 62.4% was detectable. Taken together, our results show that the protein expression pattern of deep infiltrating endometriosis (95.7%) is highly identical to the endometrium (99.3%). The protein expression profile of peritoneal endometriosis is also highly similar (84.1%) to the endometrium (99.3%), whereas the expression of the proteins in ovarian endometriosis was only modestly similar (68.7%) to the eutopic endometrial glands. Based on the results in the endometrium and endometriosis, a high degree of agreement is found in the protein expression pattern of the epithelial glands and lesions, which suggests a common origin of the distinct endometriotic lesions from the endometrium.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
aFGF	Saurer Fibroblasten- Wachstumsfaktor, Acidic fibroblast growth factor
AP	Alkalische Phosphatase
B-	Knochenmark, Bone marrow
bFGF	Basischer Fibroblasten- Wachstumsfaktor, Basic fibroblast growth factor
BSA	Rinderserumalbumin, Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
CA- 125	Cancer- Antigen 125
CD 9	CD- Molekül 9, Cluster of Differentiation 9
CD10	CD- Molekül 10, Cluster of Differentiation 10
cm	Zentimeter
COX- 2	Cyclooxygenase 2
DAB	3,3 Diaminobenzidinchromogenlösung
DGC	Dystrophin- Glykoprotein Komplex
DIE	Tief infiltrierende Endometriose, Deep infiltrating endometriosis
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Deoxyribonucleic acid
Enpp2	Ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 2
Fc- Teil	Konstanter Teil Antikörper
GnRH	Gonadotropin releasing Hormon
Gsk3β	Glykogensynthasekinase-3 Beta
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich Peroxidase, Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
JLU	Justus- Liebig- Universität
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
L	Liter
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin

Min.	Minuten
mm	Milimeter
ml	Mililiter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
n.s.	Nicht signifikant
NOS	Stickstoffmonoxid- Synthase
NSAP	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
o.a.	Oben angeführt
o.g.	Oben genannt
Pace 4	Paired basic amino acid cleaving enzyme
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, Phosphate buffer solution
Pck2	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2
PE	Peritoneum
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK- M	Phosphoenolpyruvate carboxykinase- mitochondrial
pH	Potentia hydrogenii
rASRM	Revised American Society for Reproductive Medicine score
s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
Sek.	Sekunden
SEM	Standardfehler, Standard error of the mean
Std.	Stunden
T-	Thymus
Tab.	Tabelle
TIAR	Tissue injury and repair
TNM	Klassifikation maligner Tumoren (Tumor- Nodus- Metastase)
TRIS- HCL	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan- Salzsäure
vgl.	Vergleiche
WDR 13	Tryptophan- Aspartat- repeat 13
z.B.	Zum Beispiel
β- SG	Beta- Sarcoglykan
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

8. Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

Abbildung 1.....	3
Abbildung 2.....	5
Abbildung 3.....	6
Abbildung 4.....	7
Abbildung 5.....	8
Abbildung 6.....	8

2. Material und Methode

Abbildung 7.....	21
------------------	----

3. Ergebnisse

Abbildung 8.....	42
Abbildung 9.....	42
Abbildung 10.....	43
Abbildung 11.....	44
Abbildung 12.....	45
Abbildung 13.....	46
Abbildung 14.....	46
Abbildung 15.....	47
Abbildung 16.....	48
Abbildung 17.....	49
Abbildung 18.....	50
Abbildung 19.....	51
Abbildung 20.....	52
Abbildung 21.....	53
Abbildung 22.....	54
Abbildung 23.....	55
Abbildung 24.....	56
Abbildung 25.....	57
Abbildung 26.....	58
Abbildung 27.....	59

Abbildung 28.....	60
Abbildung 29.....	61
Abbildung 30.....	62
Abbildung 31.....	63
Abbildung 32.....	64
Abbildung 33.....	65
Abbildung 34.....	66
Abbildung 35.....	67
Abbildung 36.....	68
Abbildung 37.....	70
Abbildung 38.....	71
Abbildung 39.....	72
Abbildung 40.....	73

4. Diskussion

Abbildung 41.....	76
-------------------	----

9. Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Tabelle 1.....	4
----------------	---

2. Material und Methode

Tabelle 2.....	21
Tabelle 3.....	25
Tabelle 4.....	27
Tabelle 5.....	27
Tabelle 6.....	28
Tabelle 7.....	28
Tabelle 8.....	29
Tabelle 9.....	29
Tabelle 10.....	30
Tabelle 11.....	30

Tabelle 12.....	31
Tabelle 13.....	31
Tabelle 14.....	32
Tabelle 15.....	32
Tabelle 16.....	33
Tabelle 17.....	33
Tabelle 18.....	35
Tabelle 19.....	36
Tabelle 20.....	37

3. Ergebnisse

Tabelle 21.....	39
Tabelle 22.....	39
Tabelle 23.....	40
Tabelle 24.....	69

10. Literaturverzeichnis

Abou-Setta AM, Al-Inany HG, Farquhar CM: Levonorgestrel-releasing intrauterine device (LNG-IUD) for symptomatic endometriosis following surgery. The Cochrane database of systematic reviews (2006) (4), CD005072

Abrao MS, Neme RM, Carvalho FM, Aldrighi JM, Pinotti JA: Histological classification of endometriosis as a predictor of response to treatment. *International journal of gynecology and obstetrics* (2003) 82(1), 31–40

Adamson GD: A 36-year-old woman with endometriosis, pelvic pain, and infertility. *Journal of the american medical association* (1999) 282(24), 2347–2354

Adamson GD, Kennedy SH, Hummelshoj L: Creating solutions in endometriosis: global collaboration through the World Endometriosis Research Foundation. *Journal of endometriosis* (2010) 2(1), 3–6

Ahn HJ, Yang H, An BS, Choi KC, Jeung EB: Expression and regulation of Enpp2 in rat uterus during the estrous cycle. *Journal of veterinary science* (2011) 12(4), 379–385

Allen C, Hopewell S, Prentice A, Gregory D: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. The Cochrane database of systematic reviews (2009) (2), CD004753

Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertility and sterility* (1997) 67(5), 817–821

Anastasi G, Cutroneo G, Sidoti A, Santoro G, D'Angelo R, Rizzo G, Rinaldi C, Giacobbe O, Bramanti P, Navarra G, Amato A, Favaloro A: Sarcoglycan subcomplex in normal human smooth muscle: an immunohistochemical and molecular study. *International journal of molecular medicine* (2005) 16(3), 367–374

Anastasi G, Cutroneo G, Sidoti A, Rinaldi C, Bruschetta D, Rizzo G, D'Angelo R, Tarone G, Amato A, Favaloro A: Sarcoglycan subcomplex expression in normal human smooth muscle. *Journal of histochemistry and cytochemistry* (2007) 55(8), 831–843

Anastasi G: Sarcoglycans are not muscle-specific: hypothetical roles. *Italian journal of anatomy and embryology* (2010) 115(1-2), 19–24

- Arco A, Favaloro A, Giofrè M, Santoro G, Speciale F, Vermiglio G, Cutroneo G: Sarcoglycans in the normal and pathological breast tissue of humans: an immunohistochemical and molecular study. *Cells tissues organs* (2012) 195(6), 550–562
- Kutzner H, Palmedo G (2003). Immunhistologische Techniken. In H Kerl, C Garbe, L Cerroni, HH Wolff (Hrsg.): *Histopathologie der Haut*. S. 20, Springer, Berlin (2003)
- Aznaurova YB, Zhumataev MB, Roberts TK, Aliper AM, Zhavoronkov AA: Molecular aspects of development and regulation of endometriosis. *Reproductive biology and endocrinology* (2014) 12:50
- Ballard K, Lowton K, Wright J: What's the delay? A qualitative study of women's experiences of reaching a diagnosis of endometriosis. *Fertility and sterility* (2006) 86(5), 1296–1301
- Balsa-Martinez E, Puigserver P: Cancer cells hijack gluconeogenic enzymes to fuel cell growth. *Molecular cell* (2015) 60(4), 509–511
- Ulrich U, Herchenbach J (2010). Endometriose: Eine rätselhafte Erkrankung. In E Becherer, AE Schindler (Hrsg.). *Endometriose: Ganzheitlich verstehen und behandeln- ein Ratgeber*. S. 15-23, Kohlhammer, Stuttgart (2010)
- Belling O, Ottesen K, Meyer W, Feller AC, Merz H: Vergleichende Analyse verschiedener immunhistochemischer Standardverfahren. *Der Pathologe* (1999) 20(4), 242–250
- Benagiano G, Brosens I: History of adenomyosis. *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology* (2006) 20(4), 449–463
- Bombail V, Gibson DA, Collins F, MacPherson S, Critchley HO, Saunders PT: A role for the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha in endometrial stromal cell decidualization and expression of genes implicated in energy metabolism. *Journal of clinical endocrinology & metabolism* (2010) 95(10), E224-8

- Boyle DP, McCluggage WG: Peritoneal stromal endometriosis: a detailed morphological analysis of a large series of cases of a common and under-recognised form of endometriosis. *Journal of clinical pathology* (2009) 62(6), 530–533
- Bristol-Gould, SK, Hutten CG, Sturgis C, Kilen SM, Mayo KE, Woodruff TK: The development of a mouse model of ovarian endosalpingiosis. *Endocrinology* (2005) 146(12), 5228–5236
- Brosens I, Puttemans P, Campo R, Gordts S, Kinkel K: Diagnosis of endometriosis: pelvic endoscopy and imaging techniques. *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology* (2004) 18(2), 285–303
- Brosset A: Endometriosis in the vaginal scar following vaginal hysterotomy for therapeutic abortion. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* (1954) 33(4), 445–456
- Buck Louis GM, Hediger ML, Peterson CM, Croughan M, Sundaram R, Stanford J, Chen Z, Fujimoto VY, Varner MW, Trumble A, Giudice LC: Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study. *Fertility and sterility* (2011) 96(2), 360–365
- Burney RO, Giudice LC: Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility* (2012) 98(3), 511–519
- Carrarelli P, Rocha AL, Belmonte G, Zupi E, Abrao MS, Arcuri F, Piomboni P, Petraglia F: Increased expression of antimüllerian hormone and its receptor in endometriosis. *Fertility and sterility* (2014) 101(5), 1353–1358
- Carter JE: Combined hysteroscopic and laparoscopic findings in patients with chronic pelvic pain. *Journal of the american association of gynecologic laparoscopists* (1994) 2(1), 43–47
- Castro R, Abós B, González L, Aquilino C, Pignatelli J, Tafalla C: Molecular characterization of CD9 and CD63, two tetraspanin family members expressed in trout B lymphocytes. *Developmental & comparative immunology* (2015) 51(1), 116–125

Chamie LP, Blasbalg R, Goncalves MO, Carvalho FM, Abrao MS, de Oliveira IS: Accuracy of magnetic resonance imaging for diagnosis and preoperative assessment of deeply infiltrating endometriosis. *International journal of gynaecology and obstetrics* (2009) 106(3), 198–201

Chan RW, Ng EH, Yeung, WS: Identification of cells with colony-forming activity, self-renewal capacity, and multipotency in ovarian endometriosis. *American journal of pathology* (2011) 178(6), 2832–2844

Chen J, Wang M, Waheed Khan RA, He K, Wang Q, Li Z, Shen J, Song Z, Li W, Wen Z, Jiang Y, Xu Y, Shi Y, Ji W: The GSK3B gene confers risk for both major depressive disorder and schizophrenia in the Han Chinese population. *Journal of affective disorders* (2015) 185, 149–155

Clement PB: History of gynecological pathology: IX. Dr. John Albertson Sampson. *International journal of gynecological pathology* (2001) 20, 86–101

Clement PB: The pathology of endometriosis: a survey of the many faces of a common disease emphasizing diagnostic pitfalls and unusual and newly appreciated aspects. *Advances in anatomic pathology* (2007) 14(4), 241–260

Constantin B: Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et biophysica acta* (2014) 1838(2), 635–642

Cordeiro FB, Cataldi TR, Perkel KJ, do Vale Teixeira da Costa L, Rochetti RC, Stevanato J, Eberlin MN, Zylbersztejn DS, Cedenho AP, Lo Turco EG: Lipidomics analysis of follicular fluid by ESI-MS reveals potential biomarkers for ovarian endometriosis. *Journal of assisted reproduction and genetics* (2015) 32(12), 1817–1825

Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, Koninckx PR: Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertility and sterility* (1990) 53(6), 978–983

Cramer DW: The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise. *Journal of the american medical association* (1986) 255(14), 1904

- Cramer DW, Missmer SA: The epidemiology of endometriosis. *Annals of the New York academy of sciences* (2002) 955(1), 11–22
- Cutroneo G, Bramanti P, Favalaro A, Anastasi G, Trimarchi F, Di Mauro D, Rinaldi C, Speciale F, Inferrera A, Santoro G, Arena S, Patricolo M, Magno C: Sarcoglycan complex in human normal and pathological prostatic tissue: an immunohistochemical and RT-PCR study. *Anatomical record (Hoboken)* (2014) 297(2), 327–336
- David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Gres S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clezardin P, Peyruchaud O: Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *Public library of science one* (2010) 5(3), e9741
- deHoop TA, Mira J, Thomas MA: Endosalpingiosis and chronic pelvic pain. *Journal of reproductive medicine* (1997) 42(10), 613–616
- Dharmaraj N, Chapela PJ, Morgado M, Hawkins SM, Lessey BA, Young SL, Carson DD: Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. *Human reproduction* (2014) 29(8), 1730–1738
- D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselman GA, Evers HL, Koninckx PR: Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertility and sterility* (1994) 62(3), 635–638
- D'Hooghe TM: Clinical relevance of the baboon as a model for the study of endometriosis. *Fertility and sterility* (1997) 68(4), 613–625
- Dickens NJ, Beatson S, Ponting CP: Cadherin-like domains in alpha-dystroglycan, alpha/epsilon-sarcoglycan and yeast and bacterial proteins. *Current biology* (2002) 12(6), R197-9
- Donnez J, Nisolle M, Casanas-Roux F, Bassil S, Anaf V: Rectovaginal septum, endometriosis or adenomyosis: laparoscopic management in a series of 231 patients. *Human reproduction* (1995) 10(3), 630–635

Drahota Z, Rauchova H, Mikova M, Kaul P, Bass A: Phosphoenolpyruvate shuttle-transport of energy from mitochondria to cytosol. *FEBS letters* (1983) 157(2), 347–349

Duignan NM, Jordan JA, Coughlan BM, Logan-Edwards R: One thousand consecutive cases of diagnostic laparoscopy. *Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth* (1972) 79(11), 1016–1024

Dunselman GA: The mesothelium, teflon or velcro?: Mesothelium in endometriosis pathogenesis. *Human reproduction* (2001) 16(4), 605–607

Ebert AD, Fuhr N, David M, Schnepfel L, Papadopoulos T: Histological confirmation of endometriosis in a 9-year-old girl suffering from unexplained cyclic pelvic pain since her eighth year of life. *Gynecologic and obstetric investigation* (2009) 67(3), 158–161

Ebert AD (Hrsg.): *Endometriose*. S. 1-3, S. 46, de Gruyter, Berlin (2011)

Eskenazi B, Warner ML: Epidemiology of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* (1997) 24(2), 235–258

Falcone T, Lebovic DI: Clinical management of endometriosis. *Obstetrics and gynecology* (2011) 118(3), 691–705

Farquhar C: Endometriosis. *British medical journal* (2007) 334(7587), 249–253

Ferenczy A: Pathophysiology of adenomyosis. *Human reproduction update* (1998) 4(4), 312–322

Forlenza OV, Torres CA, Talib LL, de Paula VJ, Joaquim HP, Diniz BS, Gattaz WF: Increased platelet GSK3B activity in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of psychiatric research* (2011) 45(2), 220–224

Freyer C, Kilpatrick LM, Salamonsen LA, Nie G: Pro-protein convertases (PCs) other than PC6 are not tightly regulated for implantation in the human endometrium. *Reproduction* (2007) 133(6), 1189–1197

Gao X, Wang JY, Gao LM, Yin XF, Liu L: Identification and analysis of glycogen synthase kinase 3 beta1 interactome. *Cell biology international* (2013) 37(8), 768–779

- Gargett CE, Schwab KE, Brosens JJ, Puttemans P, Benagiano G, Brosens I: Potential role of endometrial stem/progenitor cells in the pathogenesis of early-onset endometriosis. *Molecular human reproduction* (2014) 20(7), 591–598
- Garry R: The effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis. *Current opinion in obstetrics & gynecology* (2004) 16(4), 299–303
- Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, Dalkalitsis N, Paschopoulos M, Navrozoglou I, Lolis D: Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis. *Fertility and sterility* (1999) 72(1), 164–166
- Giudice LC: Clinical practice. Endometriosis. *New England journal of medicine* (2010) 362(25), 2389–2398
- Golpich M, Amini E, Hemmati F, Ibrahim NM, Rahmani B, Mohamed Z, Raymond AA, Dargahi L, Ghasemi R, Ahmadiani A: Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) signaling: Implications for Parkinson's disease. *Pharmacological research* (2015) 97, 16–26
- Gronbach J.: Charakterisierung der epithelialen Drüsen im Endometrium und endometriotischen Foci –Suche nach Ähnlichkeiten und Unterschieden zwischen Endometrium und endometriotischem Gewebe. Dissertation, Laufersweiler Verlag, Justus- Liebig Universität (2016)
- Gruenwald P: Origin of endometriosis from the mesenchyme of the celomic walls. *American journal of obstetrics & gynecology* (1942) 44(3), 470–474
- Gumbiner BM: Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* (2005) 6(8), 622–634
- Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG: Role of oxidative stress in endometriosis. *Reproductive biomedicine online* (2006) 13(1), 126–134
- Gurates B, Bulun SE: Endometriosis: The ultimate hormonal disease. *Seminars in reproductive medicine* (2003) 21(2), 125–134
- Haas D, Wurm P, Shamiyeh A, Shebl O, Chvatal R, Oppelt P: Efficacy of the revised Enzian classification: a retrospective analysis. Does the revised Enzian classification

solve the problem of duplicate classification in rASRM and Enzian? Archives of gynecology and obstetrics. (2013a) 287(5), 941–945

Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P: The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica (2013b) 92(1), 3–7

Hadfield RM, Mardon HJ, Barlow DH, Kennedy SH: Endometriosis in monozygotic twins. Fertility and sterility (1997) 68(5), 941–942

Halis G, Mechsner S, Ebert AD: The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. Deutsches Ärzteblatt International (2010) 107(25), 446–456

Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM: Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. Obstetrics and gynecology (1984) 64(2), 151–154

Hanson RW, Garber AJ: Phosphoenolpyruvate carboxykinase I. Its role in gluconeogenesis. American journal of clinical nutrition (1972) 25(10), 1010–1021

Harada T, Momoeda M, Taketani Y, Hoshiai H, Terakawa N: Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial. Fertility and sterility (2008) 90(5), 1583–1588

Hashimoto R, Yamaguchi M: Genetic link between beta-sarcoglycan and the Egfr signaling pathway. Biochemical and biophysical research communications (2006) 348(1), 212–221

Hausmann J, Kamtekar S, Christodoulou E, Day JE, Wu T, Fulkerson Z, Albers HM, van Meeteren LA, Houben AJ, van Zeijl L, Jansen S, Andries M, Hall T, Pegg LE, Benson TE, Kasiem M, Harlos K, Kooi CW, Smyth SS, Ovaa H, Bollen M, Morris AJ, Moolenaar WH, Perrakis A: Structural basis of substrate discrimination and integrin binding by autotaxin. Nature structural & molecular biology (2011) 18(2), 198–204

Hemler ME: Tetraspanin functions and associated microdomains. Nature reviews. Molecular cell biology (2005) 6(10), 801–811

- Herr MJ, Longhurst CM, Baker B, Homayouni R, Speich HE, Kotha J, Jennings LK: Tetraspanin CD9 modulates human lymphoma cellular proliferation via histone deacetylase activity. *Biochemical and biophysical research communications* (2014) 447(4), 616–620
- Hornung D, Licht P, Wallwiener D: Endometriose: Bewährte und innovative Therapiestrategien bei Schmerzen und Infertilität. *Geburtshilfe Frauenheilkunde* (2004) 64(6), 584–588
- Houben AJ, Moolenaar WH: Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer metastasis reviews* (2011) 30(3-4), 557–565
- Houghton O, McCluggage WG: Pitfalls in the diagnosis of endometriosis: a condition characterized by a plethora of unusual histological features. *Diagnostic histopathology* (2011) 17(4), 193–202
- Houston DE: Evidence for the risk of pelvic endometriosis by age, race and socioeconomic status. *Epidemiologic reviews* (1984) 6, 167–191
- Huhtinen K, Desai R, Stahle M, Salminen A, Handelsman DJ, Perheentupa A, Poutanen M: Endometrial and endometriotic concentrations of estrone and estradiol are determined by local metabolism rather than circulating levels. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2012) 97(11), 4228–4235
- Huhtinen K, Saloniemi-Heinonen T, Keski-Rahkonen P, Desai R, Laajala D, Stahle M, Hakkinen MR, Awosanya M, Suvitie P, Kujari H, Aittokallio T, Handelsman DJ, Auriola S, Perheentupa A, Poutanen M: Intra-tissue steroid profiling indicates differential progesterone and testosterone metabolism in the endometrium and endometriosis lesions. *Journal of clinical endocrinology and metabolism* (2014) 99(11), E2188-97
- Hsu CC, Yang BC, Wu MH, Huang KE: Enhanced interleukin-4 expression in patients with endometriosis. *Fertility and sterility* (1997) 67(6), 1059–1064
- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J: Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry* (2004) 73, 321–354

Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y: Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *American journal of reproductive immunology* (2009) 62(2), 90–95

Jimbo H, Hitomi Y, Yoshikawa H, Yano T, Momoeda M, Sakamoto A, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H: Evidence for monoclonal expansion of epithelial cells in ovarian endometrial cysts. *American journal of pathology* (1997) 150(4), 1173–1178

Johnson NP, Hummelshoj L: Consensus on current management of endometriosis. *Human reproduction* (2013) 28(6), 1552–1568

Juan W, Shan K, Na W, Rong-Miao Z, Yan L: The associations of genetic variants in E-cadherin gene with clinical outcome of epithelial ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer* (2016) 26(9), 1601–1607

Kamergorodsky G, Ribeiro PA, Galvão MA, Abrão MS, Donadio N, Lemos NL, Aoki T: Histologic classification of specimens from women affected by superficial endometriosis, deeply infiltrating endometriosis, and ovarian endometriomas. *Fertility and sterility* (2009) 92(6), 2074–2077

Kammerer U, Kapp M, Gassel AM, Richter T, Tank C, Dietl J, Ruck P: A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. *Journal of histochemistry & cytochemistry* (2001) 49(5), 623–630

Keckstein J (Hrsg.): Endometriose: Die verkannte Frauenkrankheit. S. 13-19, Diametric-Verlag, Würzburg (2009)

Keltz MD, Kliman HJ, Arici AM, Olive DL: Endosalpingiosis found at laparoscopy for chronic pelvic pain. *Fertility and sterility* (1995) 64(3), 482–485

Kiefer MC, Tucker JE, Joh R, Landsberg KE, Saltman D, Barr PJ: Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA and cell biology* (1991) 10(10), 757–769

Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H: Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* (2002) 83(1-5), 149–155

Koninckx PR, Martin DC: Deep endometriosis: A consequence of infiltration or retraction or possibly adenomyosis externa? *Fertility and sterility* (1992) 58(5), 924–928

Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH: Endometriotic disease: The role of peritoneal fluid. *Human reproduction update* (1998) 4(5), 741–751

Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S: Implantation versus infiltration: The Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecologic and obstetric investigation* 1999; 47(suppl. 1): (1999), 3–10

Kruitwagen RF, Poels LG, Willemsen WN, Jap PH, de Ronde IJ, Hanselaar TG, Rolland R: Immunocytochemical markerprofile of endometriotic epithelial, endometrial epithelial, and mesothelial cells: a comparative study. *European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology* (1991) 41(3), 215–223

Kyama CM, Mihalyi A, Simsa P, Falconer H, Fulop V, Mwenda JM, Peeraer K, Tomassetti C, Meuleman C, D'Hooghe TM: Role of cytokines in the endometrial-peritoneal cross-talk and development of endometriosis. *Frontiers in bioscience* (2009) 1, 444–454

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM: The dystrophin glycoprotein complex: Signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circulation research* (2004) 94(8), 1023–1031

Lee DY, Lee JY, Seo JW, Yoon BK, Choi D: Gonadotropin-releasing hormone agonist with add-back treatment is as effective and tolerable as dienogest in preventing pain recurrence after laparoscopic surgery for endometriosis. *Archives of gynecology and obstetrics* (2016) 294(6), 1257–1263

Malik E, Vogt J (2009). Endometriose. In F Leidenberger, T Strowitzki, O Ortmann (Hrsg.): *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. S. 562–575, Springer Medizin, Heidelberg (2009)

- Leithner K, Hrzenjak A, Trötz Müller M, Moustafa T, Köfeler HC, Wohlkoenig C, Stacher E, Lindenmann J, Harris AL, Olschewski A, Olschewski H: PCK2 activation mediates an adaptive response to glucose depletion in lung cancer. *Oncogene* (2015) 34(8), 1044–1050
- Levander G, Normann P: The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* (1955) 34(4), 366–398
- Leyendecker G, Wildt L, Mall G: The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Archives of gynecology and obstetrics* (2009) 280(4), 529–538
- Machairiotis N, Stylianaki A, Dryllis G, Zarogoulidis P, Kouroutou P, Tsiamis N, Katsikogiannis N, Sarika E, Courcoutsakis N, Tsiouda T, Gschwendtner A, Zarogoulidis K, Sakkas L, Baliaka A, Machairiotis C: Extrapelvic endometriosis: A rare entity or an under diagnosed condition? *Diagnostic pathology* (2013) 8, 194
- Mains RE, Berad CA, Denault JB, Zhou A, Johnson RC, Leduc R: PACE4: A subtilisin-like endoprotease with unique properties. *Biochemical journal* (1997) 321(3), 587–593
- Mais V, Ajossa S, Guerriero S, Mascia M, Solla E, Melis GB: Laparoscopic versus abdominal myomectomy: A prospective, randomized trial to evaluate benefits in early outcome. *American journal of obstetrics and gynecology* (1996) 174(2), 654–658
- Marjoribanks J, Ayeleke RO, Farquhar C, Proctor M: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *The Cochrane database of systematic reviews* (2015) (7), CD001751
- Marsch AF, Truong JN, McPherson MM, Junkins-Hopkins JM, Elston DM: A dermatopathologist's guide to troubleshooting immunohistochemistry-Part 2: Troubleshooting immunohistochemical tests in the laboratory. *American journal of dermatopathology* (2015) 37(9), 665–679
- Maruyama T, Yoshimura Y: Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis. *Frontiers in bioscience (Elite Ed)* (2012) 4, 2854–2863

May KE, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM: Endometrial alterations in endometriosis: A systematic review of putative biomarkers. *Human reproduction update* (2011) 17(5), 637–653

McCluggage WG: Paraovarian cystic endosalpingiosis in association with tamoxifen therapy. *Journal of clinical pathology* (2000) 53(2), 161–162

McLeod BS, Retzliff MG: Epidemiology of endometriosis: An assessment of risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology* (2010) 53(2), 389–396

McNally EM: The attachment disorders of muscle: Failure to carb-load. *Journal of clinical investigation* (2012) 122(9), 3046–3048

Mechsner S, Weichbrodt M, Riedlinger WF, Kaufmann AM, Schneider A, Kohler C: Immunohistochemical evaluation of endometriotic lesions and disseminated endometriosis-like cells in incidental lymph nodes of patients with endometriosis. *Fertility and sterility* (2010) 94(2), 457–463

Méndez-Lucas A, Hyroššová P, Novellademunt L, Viñals F, Perales JC: Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *Journal of biological chemistry* (2014) 289(32), 22090–22102

Merrill JA: Endometrial induction of endometriosis across Millipore filters. *American journal of obstetrics and gynecology* (1966) 94(6), 780–790

Meyer R: Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenomyome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralblatt für Gynäkologie* (1919) 36, 745–750

Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Marshall LM, Hunter DJ: Incidence of laparoscopically confirmed endometriosis by demographic, anthropometric, and lifestyle factors. *American journal of epidemiology* (2004) 160(8), 784–796

- Modaressi S, Brechtel K, Christ B, Jungermann K: Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression. *Biochemical journal* (1998) 333 (2), 359–366
- Murphy AA, Palinski W, Rankin S, Morales AJ, Parthasarathy S: Evidence for oxidatively modified lipid-protein complexes in endometrium and endometriosis. *Fertility and sterility* (1998) 69(6), 1092–1094
- Nabeshima H, Murakami T, Yoshinaga K, Sato K, Terada Y, Okamura K: Analysis of the clonality of ectopic glands in peritoneal endometriosis using laser microdissection. *Fertility and sterility* (2003) 80(5), 1144–1150
- Nagamune H, Muramatsu K, Akamatsu T, Tamai Y, Izumi K, Tsuji A, Matsuda Y: Distribution of the Kexin family proteases in pancreatic islets: PACE4C is specifically expressed in B cells of pancreatic islets. *Endocrinology* (1995) 136(1), 357–360
- Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML: Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* (2000) 19(2), 241–247
- Nguyen PT, Kudo Y, Yoshida M, Kamata N, Ogawa I, Takata T: N-cadherin expression is involved in malignant behavior of head and neck cancer in relation to epithelial-mesenchymal transition. *Histology and histopathology* (2011) 26(2), 147–156
- Nikitopoulou I, Oikonomou N, Karouzakis E, Sevastou I, Nikolaidou-Katsaridou N, Zhao Z, Mersinias V, Armaka M, Xu Y, Masu M, Mills GB, Gay S, Kollias G, Aidinis V: Autotaxin expression from synovial fibroblasts is essential for the pathogenesis of modeled arthritis. *Journal of experimental medicine* (2012) 209(5), 925–933
- Nisenblat V, Prentice L, Bossuyt PM, Farquhar C, Hull ML, Johnson N: Combination of the non-invasive tests for the diagnosis of endometriosis. *The Cochrane database of systematic reviews* (2016) 7, CD012281
- Nisolle M, Donnez J: Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertility and sterility* (1997) 68(4), 585–596

Noll S, Schaub-Kuhnen S (Hrsg.): Praxis der Immunhistochemie. S. 9-19, Urban und Fischer, München (2000)

Nordlie RC, Lardy HA: Mammalian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Journal of biological chemistry* (1963) 238, 2259–2263

Nunley WC Jr, Kitchin JD 3rd: Congenital atresia of the uterine cervix with pelvic endometriosis. *Archives of surgery* (1980) 115(6), 757–758

Oehmke F, Suwandinata F, Deisting C, Tinneberg HR: Datenlage zur Endometriose. *Gynäkologe* (2007) 40(7), 521–526

Okada H, Tsuzuki T, Shindoh H, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H: Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: Mini review. *Journal of obstetrics and gynaecology research* (2014) 40(5), 1180–1187

Olive DL, Henderson DY: Endometriosis and mullerian anomalies. *Obstetrics and gynecology* (1987) 69(3 Pt 1), 412–415

Olive DL, Schwartz LB: Endometriosis. *New England journal of medicine* (1993) 328(24), 1759–1769

Olive DL, Pritts EA: Treatment of endometriosis. *New England journal of medicine* (2001) 345(4), 266–275

Olive DL: Medical therapy of endometriosis. *Seminars in reproductive medicine* (2003) 21(2), 209–222

Ono YJ, Tanabe A, Nakamura Y, Yamamoto H, Hayashi A, Tanaka T, Sasaki H, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M: A low-testosterone state associated with endometrioma leads to the apoptosis of granulosa cells. *Public library of science one* (2014) 9(12), e115618

Oppelt P, Chavtal R, Haas D, Reichert B, Wagner S, Müller A, Lermann JH, Renner SP: Costs of in-patient treatment for endometriosis in Germany 2006: An analysis based on the G-DRG-Coding. *Gynecological endocrinology* (2012) 28(11), 903–905

Oral E, Seli E, Bahtiyar MO, Olive DL, Arici A: Growth-regulated alpha expression in the peritoneal environment with endometriosis. *Obstetrics and gynecology* (1996) 88(6), 1050–1056

Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y: Lymphocytes in endometriosis. *American journal of reproductive immunology* (2011) 65(1), 1–10

Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M: Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle nerve* (2005) 32(5), 563–576

Ozkan S, Murk W, Arici A: Endometriosis and infertility: Epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York academy of sciences* (2008) 1127, 92–100

Park GY, Lee YG, Berdyshev E, Nyenhuis S, Du J, Fu P, Gorshkova IA, Li Y, Chung S, Karpurapu M, Deng J, Ranjan R, Xiao L, Jaffe HA, Corbridge SJ, Kelly EA, Jarjour NN, Chun J, Prestwich GD, Kaffe E, Ninou I, Aidinis V, Morris AJ, Smyth SS, Ackerman SJ, Natarajan V, Christman JW: Autotaxin production of lysophosphatidic acid mediates allergic asthmatic inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* (2013) 188(8), 928–940

Park KR, Inoue T, Ueda M, Hirano T, Higuchi T, Maeda M, Konishi I, Fujiwara H, Fujii S: CD9 is expressed on human endometrial epithelial cells in association with integrins alpha 6, alpha 3 and β 1. *Molecular human reproduction* (2000) 6(3), 252–257

Prentice L, Stewart A, Mohiuddin S, Johnson NP: What is endosalpingiosis? Fertility and sterility (2012) 98(4), 942–947

Rokitansky K: Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus und Ovarialsarkomen - *Zeitschrift der Gesellschaft der Ärzte zu Wien* (1860) 16, 577–593

Rudzitis-Auth J, Nenicu A, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW: Estrogen stimulates homing of endothelial progenitor cells to endometriotic lesions. *American journal of pathology* (2016) 186(8), 2129–2142

Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA: The EnVision system: A new immunohistochemical method for

diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *Journal of clinical pathology* (1998) 51(7), 506–511

Sampson JA.: Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts of the ovary. Their importance and especially their relation to pelvic adenomas of endometrial type (“adenomyoma” of the uterus, rectovaginal septum, sigmoid, etc.). *Arch surg* (1921) 3(2), 245–323

Sampson JA: Heterotopic or misplaced endometrial tissue. *American journal of obstetrics and gynecology* (1925) 10(5), 649–664

Sampson JA: Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *American journal of pathology* (1927a) 3(2), 93–110.43

Sampson JA: Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *American journal of obstetrics and gynecology* (1927b) 14, 422–469

Sangi-Haghpeykar H, Poindexter AN 3rd: Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstetrics & gynecology* (1995) 85(6), 983–992

Schindler AE: Epidemiologie, Pathogenese und Diagnostik der Endometriose. *Journal für Fertilität und Reproduktion* (2007) 17(4), 22–27

Schweppe KW, Wynn RM, Beller FK: Ultrastructural comparison of endometriotic implants and eutopic endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology* (1984) 148(7), 1024–1039

Schweppe KW: Endometriose-Eine Erkrankung ohne Lobby (Endometriosis-a disease that has no lobby). *Zentralblatt für Gynäkologie* (2003) 125(7-8), 233

Schweppe KW, Dmowski WP, Rolland R (Hrsg.): Endometriose: Pathophysiologie, Klinik und neue Behandlungsmöglichkeiten. S. 22-25, *Aktuelles Wissen* Hoechst, Hoechst AG, Frankfurt am Main (1990)

Seli E, Berkkanoglu M, Arici A: Pathogenesis of endometriosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* (2003) 30(1), 41–61

Seo H, Choi Y, Shim J, Kim M, Ka H: Analysis of the lysophosphatidic acid-generating enzyme ENPP2 in the uterus during pregnancy in pigs. *Biology of reproduction* (2012) 87(4), 77, 1–8

Seo H, Choi Y, Yu I, Shim J, Lee CK, Hyun SH, Lee E, Ka H: Analysis of ENPP2 in the uterine endometrium of pigs carrying somatic cell nuclear transfer cloned embryos. *Asian-Australasian journal of animal sciences* (2013) 26(9), 1255–1261

Sevastou I, Kaffe E, Mouratis MA, Aidinis V: Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA axes. *Biochimica et biophysica acta* (2013) 1831(1), 42–60

Signorile PG, Baldi A: Endometriosis: New concepts in the pathogenesis. *International journal of biochemistry & cell biology* (2010) 42(6), 778–780

Sinaii N, Cleary SD, Ballweg ML, Nieman LK, Stratton P: High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: A survey analysis. *Human reproduction* (2002) 17(10), 2715–2724

Singh BN, Suresh A, UmaPrasad G, Subramanian S, Sultana M, Goel S, Kumar S, Singh L: A highly conserved human gene encoding a novel member of WD-repeat family of proteins (WDR13). *Genomics* (2003) 81(3), 315–328

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ: The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends in biochemical sciences* (1999) 24(5), 181–185

Stambolic V, Woodgett JR: Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical journal* (1994) 303 (Pt 3), 701–704

Stark R, Pasquel F, Turcu A, Pongratz RL, Roden M, Cline GW, Shulman GI, Kibbey RG: Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *Journal of biological chemistry* (2009) 284(39), 26578–26590

Stark R, Guebre-Egziabher F, Zhao X, Feriod C, Dong J, Alves TC, Ioja S, Pongratz RL, Bhanot S, Roden M, Cline GW, Shulman GI, Kibbey RG: A role for mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) in the regulation of hepatic gluconeogenesis. *Journal of biological chemistry* (2014) 289(11), 7257–7263

Stark R, Kibbey RG: The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: has it been overlooked? *Biochimica et biophysica acta* (2014) 1840(4), 1313–1330

Stefan C, Jansen S, Bollen M: NPP-type ectophosphodiesterases: Unity in diversity. *Trends in biochemical sciences* (2005) 30(10), 542–550

Stirnimann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW: WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in biochemical sciences* (2010) 35(10), 565–574

Stovall DW, Anners JA, Halme J: Immunohistochemical detection of type I, III, and IV collagen in endometriosis implants. *Fertility and sterility* (1992) 57(5), 984–989

Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA: Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *Journal of biological chemistry* (1992) 267(4), 2524–2529

Strehl JD, Hackl J, Wachter DL, Klingsiek P, Burghaus S, Renner SP, Fasching PA, Hartmann A, Beckmann MW: Correlation of histological and macroscopic findings in peritoneal endometriosis. *International journal of clinical and experimental pathology* (2014) 7(1), 152–162

Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, Faustmann T, Seitz C: Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: A 24-week, randomized, multicentre, open-label trial. *Human reproduction* (2010) 25(3), 633–641

Sumathi VP, McCluggage WG: CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *Journal of clinical pathology* (2002) 55(5), 391–392

Suresh A, Shah V, Rani DS, Singh BN, Prasad GU, Subramanian S, Kumar S, Singh L: A mouse gene encoding a novel member of the WD family of proteins is highly

conserved and predominantly expressed in the testis (Wdr13). *Molecular reproduction and development* (2005) 72(3), 299–310

Surrey ES: Gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back therapy: What do the data show? *Current opinion in obstetrics & gynecology* (2010) 22(4), 283–288

Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M: Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and sterility* (2003) 79(6), 1288–1293

Tanprasertkul C, Patumanond J, Manusook S, Suwannarurk K, Somprasit C, Sreshthaputra O, Vutyavanich T: Recurrence of endometrioma following conservative ovarian endometrioma cystectomy: Laparoscopy versus laparotomy. *Journal of the medical association of Thailand* (2015) 98 (Suppl 3), 96-100

Teng SW, Horng HC, Ho CH, Yen MS, Chao HT, Wang PH: Women with endometriosis have higher comorbidities: Analysis of domestic data in Taiwan. *Journal of the chinese medical association* (2016) 79(11), 577-582

Tsuji A, Hashimoto E, Ikoma T, Taniguchi T, Mori K, Nagahama M, Matsuda Y: Inactivation of proprotein convertase, PACE4, by alpha1-antitrypsin Portland (alpha1-PDX), a blocker of proteolytic activation of bone morphogenetic protein during embryogenesis: Evidence that PACE4 is able to form an SDS-stable acyl intermediate with alpha1-PDX. *Journal of biochemistry* (1999) 126(3), 591–603

Tsuji A, Sakurai K, Kiyokage E, Yamazaki T, Koide S, Toida K, Ishimura K, Matsuda Y: Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta- proteins and proteomics* (2003) 1645(1), 95–104

Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR: ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose (ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis). *Zentralblatt für Gynäkologie* (2005) 127(5), 275–281

van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J:

Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Molecular and cellular biology* (2006) 26(13), 5015–5022

van Meeteren LA, Moolenaar WH: Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. *Progress in lipid research* (2007) 46(2), 145–160

Velasco I, Acien P, Campos A, Acien MI, Ruiz-Macia E: Interleukin-6 and other soluble factors in peritoneal fluid and endometriomas and their relation to pain and aromatase expression. *Journal of reproductive immunology* (2010) 84(2), 199–205

Vercellini P, Fedele L, Pietropaolo G, Frontino G, Somigliana E, Crosignani PG: Progestogens for endometriosis: Forward to the past. *Human reproduction update* (2003) 9(4), 387–396

Vercellini P, Somigliana E, Vigano P, Abbiati A, Daguati R, Crosignani PG: Endometriosis: Current and future medical therapies. *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology* (2008) 22(2), 275–306

Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, Vigano P, Buggio L, Bolis G, Fedele L: The 'incessant menstruation' hypothesis: A mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention. *Human reproduction* (2011) 26(9), 2262–2273

Vincent EE, Sergushichev A, Griss T, Gingras MC, Samborska B, Ntimbane T, Coelho PP, Blagih J, Raissi TC, Choinière L, Bridon G, Loginicheva E, Flynn BR, Thomas EC, Tavaré JM, Avizonis D, Pause A, Elder DJ, Artyomov MN, Jones RG: Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase regulates metabolic adaptation and enables glucose-independent tumor growth. *Molecular cell* (2015) 60(2), 195–207

Vlek SL, Lier MC, Ankersmit M, Ket JC, Dekker JJ, Mijatovic V, Tuynman JB: Laparoscopic imaging techniques in endometriosis therapy: A systematic review. *Journal of minimally invasive gynecology* (2016) 23(6), 886–892

Vyberg M, Nielsen S: Dextran polymer conjugate two-step visualization system for immunohistochemistry. *Applied immunohistochemistry* (1998) 6(1), 3–10

Wheeler JM: Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *Journal of reproductive medicine* (1989) 34(1), 41–46

Wheeler MT, McNally EM: Sarcoglycans in vascular smooth and striated muscle. *Trends in cardiovascular medicine* (2003) 13(6), 238–243

Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Moghaddas Gholami A, Lieberenz M, Savitski MM, Ziegler E, Butzmann L, Gessulat S, Marx H, Mathieson T, Lemeer S, Schnatbaum K, Reimer U, Wenschuh H, Mollenhauer M, Slotta-Huspenina J, Boese JH, Bantscheff M, Gerstmair A, Faerber F, Kuster B: Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature* (2014) 509(7502), 582–587

Williams TJ, Pratt JH: Endometriosis in 1,000 consecutive celiotomies: Incidence and management. *American journal of obstetrics and gynecology* (1977) 129(3), 245–250

Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ: Expression of a human proprotein processing enzyme: Correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of the national academy of sciences USA* (1990) 87(23), 9378–9382

Yamada-Nomoto K, Yoshino O, Akiyama I, Ushijima A, Ono Y, Shima T, Nakashima A, Hayashi S, Kadowaki M, Osuga Y, Saito S: Alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonist inhibits the development of endometriosis by regulating inflammation. *American journal of reproductive immunology* (2016) 76(6), 491–498

Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, Chung HC, Min SK, Han JW, Lee HW, Lee HY: Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clinical & experimental metastasis* (2002) 19(7), 603–608

Yoon SO, Zhang X, Lee IY, Spencer N, Vo P, Choi YS: CD9 is a novel marker for plasma cell precursors in human germinal centers. *Biochemical and biophysical research communications* (2013) 431(1), 41–46

Yuan Z, Wang L, Wang Y, Zhang T, Li L, Cragun JM, Chambers SK, Kong B, Zheng W: Tubal origin of ovarian endometriosis. *Modern pathology* (2014) 27(8), 1154–1162

Zhu L, Chen N, Lang J (2012): Diagnosis and treatment of perineal endometriosis. In K Chaudhury, B Chakravarty (Hrsg.): *Endometriosis: Basic concepts and current research trends*, S. 53, InTech (2012)

Zito G, Luppi S, Giolo E, Martinelli M, Venturin I, Di Lorenzo G, Ricci G: Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain. *BioMed research international* (2014) 2014, 191967

Zöller M: Tetraspanins: Push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature reviews. Cancer* (2009) 9(1), 40–55

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Für die Anfertigung meiner Doktorarbeit und ihrem guten Gelingen schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich für die hilfreiche und hervorragende Betreuung bei meinem Doktorvater PD. Dr. Lutz Konrad bedanken. Die Dialoge auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene werden mir als Bereicherung in Erinnerung bleiben. Ich konnte immer und jederzeit bei Klärung von Problemen an Ihre Tür klopfen, was ich nicht vergessen werde und sehr zu schätzen weiß.

Ein weiterer Dank gilt dem geschäftsführenden Direktor und Chefarzt der Frauenklinik des Universitätsklinikums Gießen Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Rudolf Tinneberg für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Leitung durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe des Labors der Frauenklinik Gießen bedanken, ganz besonders bei den beiden netten Damen Cornelia Hof und Dorina Zoltan, mit denen die Zeit im Labor immer sehr lehrreich und herzlich war.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung auf meinem Lebensweg, ohne die ich niemals dort stehen würde, wo ich jetzt stehe. Danke Mami für alles.

Zum Schluss gilt ein besonderer Dank natürlich meinen Brüdern Dzalan, Rixtin, Nasser, Via, Rubin und Farsali für die Unterstützung und den Rückhalt in guten wie in schweren Tagen.

13. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.